

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/55, 15/10, 9/20, 1/21, C12Q 1/44		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/05288 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 4. Februar 1999 (04.02.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/04612 (22) Internationales Anmeldedatum: 23. Juli 1998 (23.07.98)		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Prioritätsdaten: 197 31 990.4 25. Juli 1997 (25.07.97) DE		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i> <i>Mit Angaben über hinterlegtes biologisches Material, eingereicht gemäss Regel 13bis getrennt von der Beschreibung.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): STU- DIENGESELLSCHAFT KOHLE MBH [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): REETZ, Manfred, T. [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr (DE). ZONTA, Albin [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr (DE). SCHIMOSSEK, Klaus [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr (DE). LIEBETON, Klaus [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr (DE). JÄGER, Karl-Erich [DE/DE]; Ruhr Universität Bochum, Fakultät f. Biologie, Universitätsstrasse 150, D-44790 Bochum (DE).			
(74) Anwälte: VON KREISLER, Alek usw.; Deichmannhaus am Hauptbahnhof, Bahnhofsvorplatz, D-50667 Köln (DE).			
(54) Title: METHOD FOR PRODUCING AND IDENTIFYING NEW HYDROLASES HAVING IMPROVED PROPERTIES			
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG UND IDENTIFIZIERUNG VON NEUEN HYDROLASEN MIT VERBESSERTEN EIGENSCHAFTEN			
(57) Abstract The invention relates to a method for producing and identifying hydrolase mutants having improved properties regarding stereoselectivity and site selectivity, catalytic activity or stability during chemical reactions.			
(57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung und Identifizierung von Hydrolase-Mutanten mit verbesserten Eigenschaften hinsichtlich der Stereo- oder Regioselektivität, katalytischen Aktivität oder Stabilität bei chemischen Umsetzungen.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zur Herstellung und Identifizierung von neuen Hydrolasen mit verbesserten Eigenschaften

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung und Identifizierung von Hydrolase-Mutanten mit verbesserten Eigenschaften hinsichtlich ihrer Stereo- oder Regioselektivität, katalytischen Aktivität oder Stabilität bei chemischen Umsetzungen.

Stand der Technik:

Hydrolasen gehören zu den am weitesten verbreiteten Enzymen in der organischen Synthese. Als Untergruppe der Hydrolasen katalysieren insbesondere Esterasen und Lipasen eine Vielzahl von Reaktionen wie z.B. die Hydrolyse von Carbonsäureestern, oder die Synthese von Estern bzw. Umesterungen in organischen Lösungsmitteln. Ihre hohe Stereoselektivität, Stabilität und gute Verfügbarkeit machen sie für zahlreiche industrielle Prozesse interessant. So werden z.B. Lipasen bereits industriell zur Racematspaltung von chiralen Alkoholen, Säuren oder Aminen eingesetzt, für die Darstellung enantiomerenreiner Arzneimittel, Naturstoffe, Pflanzenschutzmittel oder hochwertiger Fette und Öle (K.Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin, 2. Aufl. 1995). Dennoch lässt sich die Enantioselektivität einer Lipase bzw. Esterase gegenüber einem gegebenen Substrat nicht mit Sicherheit vorhersagen und in vielen Fällen verlaufen die Umsetzungen nur mit mäßigen optischen Ausbeuten. Es besteht daher ein Bedarf nach einem Verfahren zur Herstellung von Hydrolasen, das eine gezielte Optimierung der Enantioselektivität hinsichtlich eines gewünschten Produktes und der speziellen Prozeßbedingungen wie Temperatur und Lösungsmittel ermöglicht. Mit Hilfe der heute gebräuchlichen molekularbiologischen Methode der *in vitro*-Mutagenese ließen sich zwar Effekte auf die Enantioselektivität von Lipasen studieren (K.Hult, M. Holmquist, M. Martinelle, *European Symposium on Biocatalysis*, Graz, 1993, Abstracts, L-4), es konnte jedoch keine

Optimierung hinsichtlich eines bestimmten Substrates erreicht werden, die zu einem organisch-synthetisch nutzbaren Enzym geführt hat.

Zu den bedeutendsten Einsatzmöglichkeiten der Gentechnik gehört das Proteindesign, bei dem auf der Grundlage bekannter Strukturdaten mit Hilfe der *in vitro*-Mutagenese basenspezifisch Mutationen in die Gensequenz des entsprechenden Proteins eingeführt werden. Durch gezielten Austausch von Aminosäuren ließen sich auf diese Weise schon Enzyme mit verbesserter katalytischer Aktivität oder Stabilität herstellen (A. Shaw, R. Bott, *Current Opinion in Structural Biology*, 1996, 6, 546). Diese Technik, die sogenannte oligonukleotidgerichtete (*oligonucleotide-directed*) oder gezielte Mutagenese (*site-directed mutagenesis*), beruht auf dem Ersatz eines kurzen Sequenzabschnitts des Gens für das natürlich vorkommende Enzym (Wildtyp) durch ein synthetisch mutagenisiertes Oligonukleotid. Nach anschließender Expression des Gens erhält man eine Enzym-Mutante, die vorteilhafte Eigenschaften aufweisen kann. In einem davon abgeleiteten Verfahren, der sogenannten Kassettenmutagenese (*cassette mutagenesis*), werden Oligonukleotide mit partiell randomisierten Sequenzen eingesetzt. Dadurch erhält man eine begrenzt große Bibliothek von Mutanten, die dann hinsichtlich ihrer Eigenschaften getestet werden kann.

Trotz der Vorteile dieser etablierten Methoden eignen sie sich nur schlecht für die schrittweise Optimierung eines Enzyms, bzw. zur Erzeugung von Enzymen mit neuen Eigenschaften. Das bis heute unvollständige Verständnis der Gesetzmäßigkeiten der Proteinfaltung und der Struktur-Funktions-Beziehung bei Proteinen ist die Hauptursache für das Scheitern vieler Projekte auf dem Gebiet des sogenannten rationalen Proteindesigns. Zudem ist ein schrittweiser Optimierungsprozeß nach der klassischen Methode relativ arbeitsaufwendig und garantiert keine signifikante Verbesserung der Enzymeigenschaften *per se*.

In jüngster Zeit wurden neue molekularbiologische Methoden zur Mutagenese beschrieben, die auf der literaturbekannten Polymerase-Kettenreaktion (R.K. Saiki, S.J. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn,

H.A. Erlich, N. Arnheim, *Science*, 1985, 230, 1350) beruhen (D.W. Leung, E. Chen, D.V. Goeddel, *Technique*, 1989, 1, 11 und W. P.C. Stemmer, A. Crameri, PCT WO 95/22625). Anstelle der gezielten Mutagenese werden hierbei kombinatorische Methoden zur Erzeugung umfangreicher Mutantenbibliotheken eingesetzt, die nachfolgend mit Hilfe geeigneter Screeningverfahren nach Mutanten mit positiven Eigenschaften durchsucht werden. Dabei werden die in der Natur vorkommenden evolutiven Prozesse der Replikation bzw. Rekombination, der Mutation und Selektion auf molekularer Ebene nachgeahmt. Diese als *in vitro*-Evolution (oder *directed evolution*) beschriebene Methode hat sich bereits in einigen Fällen als brauchbare Methode zur Gewinnung neuer Biokatalysatoren bewährt (W.P.C. Stemmer, *Nature*, 1994, 370, 389 und F.H. Arnold, *Chemical Engineering Science*, 1996, 51, 5091).

Trotz der erzielten Fortschritte auf diesem Gebiet lässt sich dieses Verfahren bisher nicht generell auf alle Enzymklassen übertragen, da es meist an geeigneten Testmethoden zur Identifizierung von Mutanten mit positiven Eigenschaften fehlt. Diese sind aber zwingend erforderlich angesichts der großen Anzahl von mutierten Enzymvarianten, die bei der Erzeugung kombinatorischer Mutantenbibliotheken zu erwarten sind. Insbesondere im Fall der für industrielle Prozesse interessanten Lipasen ist es bisher nicht gelungen, Mutanten mit verbesserter Stereoselektivität mit den Methoden der *in vitro*-Evolution zu erzeugen, weil ein effizientes Screening-Verfahren zum Test auf Enantioselektivität bis heute nicht existiert. Die klassische Methode zur Bestimmung der Enantioselektivität einer Lipase- bzw. Esterase-katalysierten Umsetzung beruht auf der flüssig-, bzw. gaschromatographischen Trennung der Reaktionsprodukte und Edukte unter Verwendung von chiral modifizierten, stationären Phasen. Diese Methode ist jedoch aufgrund des enormen Probenaufkommens im Zuge des Screenings von umfangreichen Mutantenbibliotheken ungeeignet, da chromatographische Trennungen mit chiral modifizierten Säulen zeitaufwendig sind und nur nacheinander durchgeführt werden können. Ein weiteres bisher ungelöstes Problem betrifft die häufig zu beobachtende Schwierigkeit, funktionelle Lipasen bzw. Esterasen in Wirtsorganismen mit genügend hoher Aktivitäts-

Ausbeute zu exprimieren. Dies ist jedoch für ein leistungsfähiges Screeningsystem unverzichtbar, da zu geringe Enzym-Aktivitäten bei der Bestimmung der Enantioselektivität aufgrund der begrenzten Empfindlichkeit eines Testsystems nur schwer nachzuweisen sind.

Gegenstand der Erfindung:

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein einfaches Verfahren zur Herstellung von mutierten Hydrolasen, insbesondere Lipasen bzw. Esterasen, mit verbesserter Stereo-, bzw. Regioselektivität, katalytischer Aktivität und Stabilität gegenüber gegebenen Substraten (z.B. Carbonsäuren, Alkoholen, Aminen sowie deren Derivaten) zu entwickeln, das zudem eine schnelle Identifizierung positiver Mutanten aus umfangreichen Mutantenbibliotheken ermöglicht, sowie die Verwendung der so hergestellten Enzyme bei der Racematspaltung von chiralen Alkoholen, Säuren und Aminen sowie deren Derivaten.

Beschreibung der Erfindung:

Die Herstellung der neuen Biokatalysatoren beginnt in der Regel mit der Isolierung eines Lipase- bzw. Esterase-Gens aus dem Ursprungsorganismus. Hierfür kommen alle mikrobiellen, pflanzlichen und tierischen Organismen in Frage, die Träger eines Lipase- bzw. Esterase-Gens sind. Die Genisolierung kann nach den literaturbekannten Methoden vorgenommen werden (J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, New York). In der Regel wird dazu die genomische DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen fragmentiert und die erhaltenen Genfragmente in einem Wirtsorganismus (z.B. *E. coli*) kloniert. Unter Verwendung von Oligonukleotiden, die sequenzhomolog zu einem Abschnitt des Lipase- bzw. Esterase-Gens sind, wird dann in Hybridisierungsexperimenten das Gen in der Genbank identifiziert und nachfolgend isoliert.

Überraschend wurde im Rahmen der Erfindung gefunden, daß durch eine modifizierte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Veränderung bestimmter Reaktionsparameter natürlich vorkommende Hydrolasegene derart mutagenisiert werden können, daß eine umfangreiche Mutantenbibliothek erhalten wird, die mit Hilfe eines neuartigen Testverfahrens nach Mutanten mit verbesserter Enantioselektivität durchsucht werden kann.

Die Neuartigkeit des Verfahrens besteht darin, daß ausgehend von einem natürlich vorkommenden Lipase- bzw. Esterase-Gen (dem sogenannten Wildtyp-Gen) unter Verwendung einer modifizierten PCR (im folgenden als *mutagenisierende PCR* bezeichnet) eine umfangreiche, randomisierte Mutantenbibliothek angelegt werden kann. Dabei wurde gefunden, daß durch Veränderung der PCR-Reaktionskomponenten die Mutationsfrequenz während der PCR gezielt eingestellt werden kann. Durch die Variation der Mg^{2+} - und/oder der Desoxynucleotid-Konzentrationen und/oder der Zugabe von Mn^{2+} -Ionen läßt sich die Anzahl der Mutationen im betrachteten Lipase-Gen (Mutationsfrequenz) steuern. Vorzugsweise werden hierzu folgende Konzentrationen in Abhängigkeit der verwendeten DNA-Polymerase benutzt:

Mg^{2+} : 1,5 mM - 8,0 mM

dNTP : 0,05 mM - 1,0 mM

Mn^{2+} : 0,0 mM - 3,0 mM

Außerdem wurde gefunden, daß die Zyklenzahl der PCR-Reaktion mit der Anzahl der Mutationen korreliert: je höher die Zyklenzahl gewählt wird, desto höher die Gesamtanzahl der Mutationen. Mit Hilfe dieses Parameters läßt sich die Diversität der Mutantenbibliothek einstellen.

Zur Bestimmung der Mutationsfrequenz werden die aufgereinigten PCR-Produkte sequenziert. Durch Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit der Sequenz des Wildtyp-Gens läßt sich die Mutationsfrequenz bestimmen.

Tabelle 1 zeigt die Abhängigkeit der Mutationsfrequenz von der Konzentration obengenannter PCR-Reaktionskomponenten bei der Amplifizierung des Lipase-Gens aus *P. aeruginosa* (*lipA*).

Tabelle 1

Versuch	Mg ²⁺ (mM)	Mn ²⁺ (mM)	dATP/ dGTP (mM)	dTTP/ dCTP (mM)	Mutations- frequenz (Mutationen /1000 bp ¹⁾)
1	6,1	-	0,2	0,2	1-2
2	7,0	0,5	0,2	1,0	15-20

¹⁾ bp = Basenpaare

Aufgrund der Resultate der Sequenzierung ergibt sich weiterhin, daß als Mutationsarten Transitionen und Transversionen statistisch in etwa gleicher Häufigkeit auftreten. Deletionen und Insertionen werden hingegen nur selten beobachtet. Zudem liegen die Mutationen über das ganze Lipase-Gen gleich verteilt vor. Somit läßt sich mit der beschriebenen Methode eine Mutantenbank mit statistisch gleichverteilten Mutationen erzeugen. Als vorteilhaft hat sich eine Mutationsfrequenz von 1-2 Mutationen / Hydrolasegen erwiesen. Dadurch wird verhindert, daß beim Auftreten mehrerer Mutationen pro Hydrolasegen eine negative Mutation eine Mutation mit positivem Effekt maskiert. Um eine komplette Mutantenbibliothek mit jeweils einem Aminosäureaustausch pro Enzymmolekül zu erhalten, müssen bei einer Lipase, die aus 285 Aminosäuren (hier: Lipase aus *P. aeruginosa*) besteht, theoretisch 5415 Mutanten erzeugt werden. Dieser Wert ergibt sich gemäß folgendem Algorithmus:

$$N = 19 \times M \times 285! / [(285 - M)! \times M!]$$

mit N = Anzahl der Mutanten und M = Anzahl der Aminosäure-Austausche pro Lipase-Molekül. Im Rahmen der Erfindung konnte überraschend gezeigt werden, daß bereits bei weitaus geringeren Bibliotheksgrößen positive Mutanten gefunden werden, wobei mit einer Mutationsfrequenz von 1-2 gearbeitet wurde.

Die nach dem beschriebenen Verfahren erhaltenen mutierten Lipase- bzw. Esterase-Gene werden in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert und dann nach einem Wirtsorganismus, z.B. *E. coli*, transformiert. Anschließend werden die transformierten Zellen auf Agarplatten ausgestrichen und kultiviert. Sofern eine genügend hohe Expressionsrate vorliegt, können die erhaltenen Kolonien in mit Flüssigmedium versehene Mikrotiterplatten überführt werden und nach dem Anwachsen direkt zum Screeningtest eingesetzt werden. Für den Fall, daß bei der Expression des Lipasegens nur wenig Enzym gebildet wird, bzw. das Genprodukt im verwendeten Wirtsorganismus nicht korrekt gefaltet (Inklusionskörper) oder unvollständig in das Kulturmedium sekretiert wird, ist es vorteilhaft, die mutierten Gene in einen anderen Wirtsorganismus, vorzugsweise den Ursprungsorganismus, umzuklonieren.

Um genügend hohe Enzymaktivitäten zu erhalten, werden die einzelnen Bakterienklone, die ein mutiertes Lipase- bzw. Esterase-Gen enthalten, von den Agarplatten in die Tröge von handelsüblichen Mikrotiterplatten überführt und dort in Flüssigmedium angezogen. Vorzugsweise werden hierfür Mikrotiterplatten mit 96 Trögen pro Platte benutzt. Das Wachstum der Bakterien kann durch Messung der Zelldichte (OD₆₀₀-Wert) kontrolliert werden. Es ist vorteilhaft, parallel eine zweite Mikrotiterplatte auf diese Weise anzuimpfen, um so eine Referenz für die spätere Identifizierung positiver Klone zu haben. Diese wird zweckmäßigerweise nach dem Anwachsen der Bakterien mit Glycerin versetzt und bis zur Identifizierung bei -80°C gelagert. Sofern die Bakterien das Enzym in den Extrazellularraum sekretieren (z.B. bei der Lipase aus *P. aeruginosa*), werden die Zellen in den Mikrotiterplatten abzentrifugiert und der Überstand mit der Lipase- bzw. Esterase-Aktivität zum Screeningtest eingesetzt. Für den Fall, daß die Bakterien (z.B. *E. coli*) das Enzym in das Periplasma sezernieren, muß vorher eine Zellwand-Lyse durchgeführt werden, wobei literaturbekannte Methoden wie z.B. eine Lysozym-Behandlung angewendet werden können.

Durch Anzucht der zugehörigen Klone von der Referenzplatte läßt sich ausreichend Plasmid-DNA isolieren, die zur Charakterisierung des

mutierten Lipase- bzw. Esterase-Gens eingesetzt werden kann. Durch Sequenzierung werden die Mutationen im Gen lokalisiert. Ein Vorteil der Erfindung betrifft die Tatsache, daß auch ohne Kenntnisse der exakten Position der Mutationen in einem positiven Klon, das mutierte Gen in weiteren Mutations-Zyklen nach dem beschriebenen Verfahren hinsichtlich seiner Eigenschaften weiter optimiert werden kann. Dazu wird das isolierte Lipase- bzw. Esterase-Gen erneut in einer nach den oben angegebenen Bedingungen modifizierten PCR (*mutagenisierende PCR*) eingesetzt. Diese Prozedur kann so oft wiederholt werden, bis die Eigenschaften der Lipase- bzw. Esterase-Mutante den Anforderungen an die stereoselektive Umsetzung genügen.

Zur weiteren Optimierung der identifizierten positiven Mutanten läßt sich das beschriebene Verfahren dergestalt erweitern, daß die DNA mehrerer Positiv-Mutanten zunächst fragmentiert wird und dann in einem kombinatorischen Prozeß nach W.P.C. Stemmer (*Nature*, 1994, 370, 389) zu funktionalen Lipase- bzw. Esterase-Genen reassembliert werden kann. Die so erhaltene *in vitro*-Rekombinantenbibliothek wird anschließend exprimiert und die rekombinanten Genprodukte mit Hilfe der erfindungsgemäßen Testverfahren auf verbesserte Enantioselektivität hin untersucht. Der Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, daß sich aufgrund der Rekombination die positiven Eigenschaften verschiedener Lipase- bzw. Esterase-Mutanten in einem neuen rekombinanten Gen addieren können, was letztlich zu einer weiteren Verbesserung der Lipase bzw. Esterase führen kann. Der Ablauf des beschriebenen Verfahrens ist wie folgt:

Die Lipase- bzw. Esterase-Gene werden zunächst mit Hilfe des Enzyms DNase I (z.B. aus Rinder-Pankreas) in Fragmente gespalten mit einer vorzugsweise Länge zwischen 25 Bp und 100 Bp. Die Größe der Fragmente läßt sich durch Auftrennung mittels einer Agarose-Gelelektrophorese und Vergleich mit entsprechenden DNA-Längenmarkern kontrollieren. Die so erhaltenen DNA-Fragmente werden aufgereinigt, um sie von anhaftender DNase zu befreien. Die *in vitro*-Rekombination wird unter den Bedingungen einer konventionellen PCR

durchgeführt, wobei keine PCR-Primer zugesetzt werden. Analog zur konventionellen PCR unterteilt sich ein Zyklus in drei Schritte: a) Denaturierung, b) Annealing und c) Elongation. Während des Annealings kommt es zu einer Hybridisierung sequenzhomologer Fragmente, die aus unterschiedlichen mutierten Lipase- bzw. Esterase-Genen stammen können. Im nachfolgenden Elongationsschritt werden die Stränge durch die DNA-Polymerase vervollständigt, so daß schließlich neue, rekombinante Lipasegene erhalten werden. Die optimale Anzahl der Zyklen wird in einem Vorversuch bestimmt. Dazu trennt man nach jeweils 5 Zyklen eine geringe Probe des Reaktionsansatzes mittels Agarose-Gelelektrophorese auf und ermittelt daraus den Zyklus, bei dem das Maximum der Größenverteilung der Rekombinanten im Bereich der Größe des Enzym-Gens liegt. Vorzugsweise wird eine Zyklenzahl zwischen 30 und 45 gewählt. Die erhaltene Bande im Agarosegel, die der Größe nach dem Lipase- bzw. Esterase-Gen entspricht, wird aufgereinigt und durch eine konventionelle PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wird aufgereinigt und nach Ligation in einen geeigneten Vektor (Plasmid) nach *E. coli* transformiert. Wie bereits im Abschnitt über die *mutagenisierende PCR* besprochen, kann es erforderlich sein, in einen anderen Wirtsorganismus umzuklonieren, falls die Lipaseaktivität nach der Expression in *E. coli* zu gering sein sollte. Die erhaltenen Rekombinanten werden für den Test auf Enantioselektivität in Mikrotiterplatten angezogen.

In einer Variante der Erfindung können die beschriebenen Verfahren der *mutagenisierenden PCR* und der *in vitro*-Rekombination zur Erzeugung von Mutations- bzw. Rekombinantenbibliotheken nacheinander in beliebiger Reihenfolge und Häufigkeit durchgeführt bzw. wiederholt werden, um die Enantioselektivität der Lipase bzw. Esterase zu optimieren. Vorzugsweise wird zu Beginn mindestens ein Mutationszyklus mittels *mutagenisierender PCR* durchgeführt. Im Anschluß daran kann dann ein *in vitro*-Rekombinations-Zyklus erfolgen, wobei die jeweils besten positiven Mutantenklone eingesetzt werden. Durch Kontrolle der Enantioselektivität der erhaltenen Enzym-Mutanten läßt sich der Optimierungsprozeß verfolgen.

bibliothek kann dann exprimiert werden und nach verbesserter Enantioselektivität gescreent werden.

Positive Lipase- bzw. Esterase-Mutanten, die durch das Screening von Mutanten- oder Rekombinantenbibliotheken identifiziert wurden, können mit Hilfe der ortsgerichteten Sättigungsmutagenese weiter optimiert werden. Dazu wird die positive Mutation in dem Lipase- bzw. Esterase-Gen zunächst durch Sequenzierung lokalisiert. Anschließend wird dieses Gen mittels einer beliebigen Methode zur ortsgerichteten Mutagenese, die einen mehrfachen Basenaustausch zuläßt, so verändert, daß alle möglichen Codons an der Stelle des Gens entstehen, die für die zu optimierende Position kodiert. Auf diese Weise erhält man eine begrenzt große Bibliothek von Mutanten, bei denen an der zu optimierenden Aminosäure-Position die ursprünglich vorhandene Aminosäure durch die restlichen 19 Aminosäuren ersetzt ist. Die so erhaltene, begrenzt große Mutantenbibliothek kann dann exprimiert werden und nach verbesserter Enantioselektivität gescreent werden.

In einer Variante des beschriebenen Verfahrens wird das Lipase- bzw. Esterase-Gen des Wildtyp-Enzyms zusammen mit den gefundenen Positiv-Mutanten zur *in vitro*-Rekombination eingesetzt. Dadurch kann es zu Rückkreuzungen kommen, bei denen Mutationen mit neutralen oder negativen Eigenschaften eliminiert werden können. Die erhaltene Rekombinantenbibliothek kann nach der Expression auf verbesserte Enantioselektivität untersucht werden.

In einer weiteren Variante des beschriebenen Verfahrens werden Hydrolasegene aus unterschiedlichen Organismen zur *in vitro*-Rekombination eingesetzt, sofern sie eine genügende Sequenzhomologie zu dem ursprünglich eingesetzten Hydrolasegen besitzen.

In einer Variante des Verfahrens wird die *in vitro*-Rekombination unter den Bedingungen der beschriebenen modifizierten PCR durchgeführt. Dazu wird die Konzentration der Mg^{2+} - bzw. Mn^{2+} -Ionen sowie die der Desoxy-

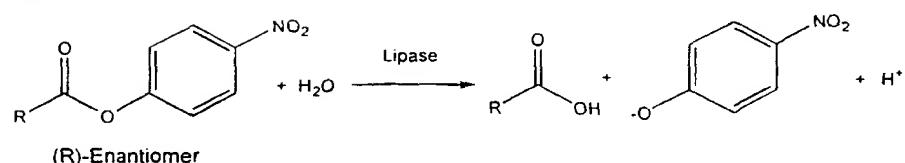
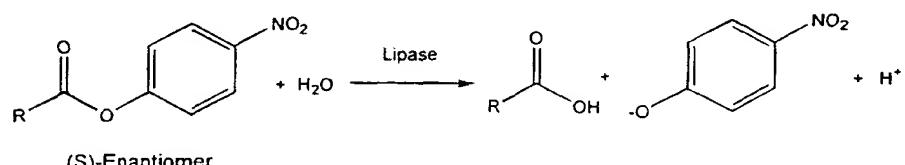
nucleotide (dNTPs) verändert, um gezielt die Mutationsfrequenz während der *in vitro*-Rekombination zu einzustellen.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Testverfahren, die die Identifizierung von Enzym-Mutanten mit verbesserter Stereoselektivität oder Regioselektivität aus umfangreichen Mutantenbibliotheken ermöglichen. Dazu werden zwei gleiche Aliquots des enzymhaltigen Überstandes nach der Zentrifugation der Bakterienzellen in jeweils benachbarte Tröge einer neuen Mikrotiterplatte überführt. Nach Zugabe der beiden enantiomeren Substrate in jeweils einen der Tröge wird die Aktivität der Lipase bzw. Esterase spektrophotometrisch bestimmt. Die Messungen werden in einem handelsüblichen Spektralphotometer für Mikrotiterplatten durchgeführt. Dadurch wird ein hoher Probendurchsatz ermöglicht. Die Wahl des Substrates richtet sich nach der Art der chiralen Verbindung, für die eine Optimierung der Lipase bzw. Esterase vorgenommen werden soll. Insbesondere eignet sich das Verfahren für chirale Carbonsäuren, Alkohole und Amine.

Im Fall von chiralen Carbonsäuren bzw. chiralen COOH-funktionalisierten Verbindungen werden die beiden entsprechenden p-Nitrophenylester der (R)- bzw. (S)-Säure als Testsubstrat eingesetzt. Formel 1 zeigt das Prinzip des Testverfahrens, wobei R einen beliebigen organischen Rest mit mindestens einem asymmetrischen Zentrum symbolisiert.

Formel 1

Schema für das Testverfahren auf Stereoselektivität bei chiralen Carbonsäuren bzw. COOH-funktionalisierten Verbindungen

Reaktion 1:Reaktion 2:

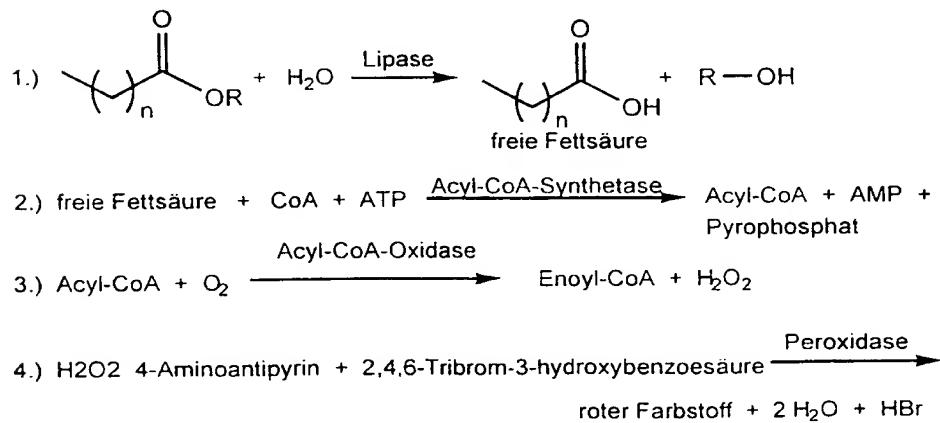
Aufgrund der hohen Extinktion des bei der Hydrolase-katalysierten Esterhydrolyse freigesetzten p-Nitrophenolat-Anions ($\lambda_{\text{max}}=405$ nm, $E_{\text{max}}=14.000$) ergibt sich ein hochempfindliches Testverfahren, mit dem eine Aktivitätsbestimmung auch bei niedrigen Substratkonzentrationen durchgeführt werden kann. Die Enantioselektivität der Hydrolase-Mutanten lässt sich aus dem Quotienten der Hydrolysegeschwindigkeiten $V_{\text{app}}(\text{R})$ und $V_{\text{app}}(\text{S})$ für den (R)- und den (S)-Ester mit ausreichender Genauigkeit bestimmen. Da die beiden Testansätze jeweils nur ein Enantiomer enthalten (entweder den R- oder S-Ester), muß bei der Bestimmung der Enantioselektivität die fehlende Konkurrenzreaktion mit dem anderen Enantiomer berücksichtigt werden. Dieser kinetische Effekt kann zwar zur Berechnung fehlerbehafteter Enantioselektivitäten führen, es hat sich jedoch gezeigt, daß die nach der vorgestellten Methode erhaltenen apparenten Enantioselektivitäten (E_{app}) genügend Aussage-kraft hinsichtlich der Enantioselektivität der mutierten Lipasen haben. E_{app} ergibt sich als $V_{\text{app}}(\text{R}) / V_{\text{app}}(\text{S})$. Ein weiterer Vorteil liegt in der einfachen Durchführung und guten Reproduzierbarkeit des Tests, der sich auch für ein Screening mit hohem Probendurchsatz eignet.

Im Fall von chiralen Alkoholen bzw. von chiralen OH-funktionalisierten Verbindungen werden Fettsäureester der beiden enantiomerenreinen Alkohole für den Test auf Stereoselektivität eingesetzt. Die Kettenlänge der Fettsäuren liegt im Bereich von C₂ bis. Als Alkohol-Komponente können primäre, sekundäre und tertiäre Alkohole sowie deren Derivate mit minde-

stens einem Asymmetriezentrum eingesetzt werden. Lösungen der Ester der (R)- und (S)-Alkohole werden in jeweils benachbarten Trögen einer Mikrotiterplatte mit Kulturüberständen der Hydrolase-Mutanten hydrolysiert. Die Hydrolysegeschwindigkeiten $V_{app(R)}$ und $V_{app(S)}$ der (R)- und (S)-Ester sind ein Maß für die Enantioselektivität der untersuchten Enzym-Mutante. Die Detektion erfolgt über eine gekoppelte Enzymreaktion (H.U. Bergmeyer, *Grundlagen der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim, 1977), bei der die kontinuierliche Freisetzung der Fettsäure verfolgt wird. Der gebildete Farbstoff wird colorimetrisch bei 546 nm ($\epsilon = 19,3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) bestimmt. Die Konzentrationen der Enzyme, Co-faktoren und Coenzyme der Hilfsreaktionen 2 und 3 (siehe Formel 2) sowie der Indikatorreaktion 4 müssen so gewählt werden, daß die zu bestimmende Lipase- bzw. Esterase-katalysierte Reaktion geschwindigkeitsbestimmend ist. Der Quotient der Hydrolysegeschwindigkeiten des (R)- und (S)-Esters entspricht der apparenten Enantioselektivität (E_{app}). In einer Variante werden anstelle der enantiomerenreinen Ester die Fettsäureamide chiraler Amine bzw. NH_2 - oder NHR-funktionalisierter Verbindungen eingesetzt. Formel 2 zeigt das Schema des Testsystems.

Formel 2

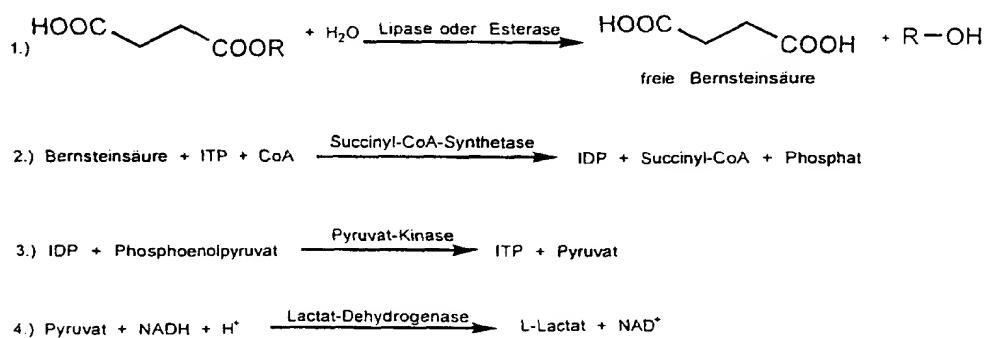
Schema für das Testverfahren auf Stereoselektivität bei chiralen Alkoholen; R symbolisiert einen beliebigen organischen Rest mit mindestens einem asymmetrischen Zentrum; Abkürzungen: CoA (Coenzym A), ATP (Adenosin-5'-triphosphat), AMP (Adenosin-5'-monophosphat)



In einer Variante des Verfahrens können anstelle der Fettsäureester bzw. -amide die entsprechenden Ester und Amide der Bernsteinsäure eingesetzt werden. Diese haben gegenüber den Fettsäuren den Vorteil der besseren Löslichkeit in wässrigen Lösungen bzw. wässrig-organischen Solventien. Die Messung erfolgt UV-spektrometrisch bei 340 nm ($\epsilon = 6,3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Auch bei diesem Testverfahren ist zu beachten, daß die Hydrolase-katalysierte Reaktion 1 geschwindigkeitsbestimmend ist. Der Quotient der Hydrolysegeschwindigkeiten $V_{\text{app}}(R)$ und $V_{\text{app}}(S)$ des (R)- und (S)-Esters entspricht der apparenten Enantioselektivität (E_{app}). In einer Variante werden anstelle der enantiomerenreinen Ester die Fettsäureamide chiraler Amine eingesetzt. Als Amin-Komponente können sowohl primäre als auch sekundäre Amine eingesetzt werden. Das Schema des Testverfahrens ist in Formel 3 wiedergegeben.

Formel 3

Schema für das Testverfahren auf Stereoselektivität bei chiralen Alkoholen; R symbolisiert einen beliebigen organischen Rest mit mindestens einem asymmetrischen Zentrum; Abkürzungen: CoA (Coenzym A), ITP (Inosin-5'-triphosphat), IDP (Inosin-5'-diphosphat), NADH / NAD⁺ (reduziertes bzw. oxidiertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid)



Der Test zur Identifizierung von Hydrolase-Mutanten mit verbesserter Stereoselektivität kann weiterhin derart ausgeführt werden, daß beide Stereoisomere im Testansatz enthalten sind. Dadurch kann auf die getrennte Messung des (R)- und (S)-Enantiomers verzichtet werden. Das Testprinzip geht von einer Anbindung eines racemischen Gemisches des chiralen

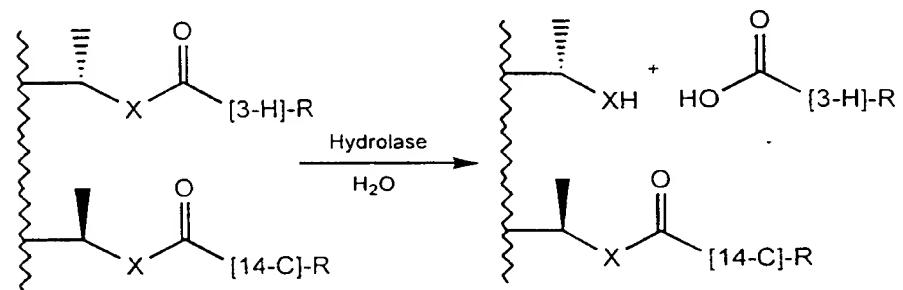
Substrates an einer Festphase aus. Über eine Ester- bzw. Amidbindung an dieser chiralen Verbindung wird ein radioaktiv markierter organischer Rest gebunden. Zwei Fälle lassen sich unterscheiden:

- Festphasen-gebundene chirale Carbonsäure: die Carboxylfunktion wird mit einem radioaktiv markierten Alkohol verestert
- Festphasen-gebundener chiraler Alkohol oder chirales Amin, bzw. OH- oder NH₂- (NHR-)funktionalisierte Verbindungen: die Hydroxyl- bzw. Aminfunktion wird mit einer radioaktiv markierten Carbonsäure markiert.

Entscheidend ist dabei, daß die beiden Enantiomeren des an der Festphase gebundenen racemischen Gemisches mit unterschiedlichen Isotopen markiert sind. Vorzugsweise werden ³H und ¹⁴C-markierte Verbindungen eingesetzt. Als Festphase können sowohl alle gängigen organischen, funktionalisierten Polymere sowie anorganische, funktionalisierte Träger eingesetzt werden. Vorzugsweise werden Festphasen auf Polystyrol-Basis und Kieselgel-Träger eingesetzt. Anschließend werden die chiralen, radioaktiv markierten Verbindungen an die Festphase gebunden, wobei die Kupplung an die Festphase an die chemische Beschaffenheit des chiralen Substrates angepaßt werden muß. Formel 4 zeigt das Schema der modifizierten Festphase und das Prinzip des Testverfahrens.

Formel 4

Schema des Festphasen-Screeningtests auf Stereoselektivität mit doppelt radioaktiv markiertem Sustrat; (X = O, NH; R ist ein radioaktiv markierter, organischer Rest)



Etwa gleiche Mengen des so modifizierten Trägers können in kleine Reaktionsgefäße verteilt werden (z.B. in die Tröge von Mikrotiterplatten) und dann mit den Kulturüberständen der Hydrolase-Mutanten versetzt werden. Bei der anschließenden Reaktion werden die radioaktiv markierten Komponenten (Carbonsäure oder Alkohol) von der Festphase hydrolysiert und in das flüssige Medium abgegeben. Ein Aliquot des Mediums wird dann entnommen und in einem Szintillationsmeßgerät auf die Menge an Radioaktivität hin untersucht. Aus dem Verhältnis der beiden unterschiedlichen Isotope zueinander kann der Enantiomerenüberschuß und der Umsatz der Reaktion und somit die Enantioselektivität der mutierten Esterase bzw. Lipase berechnet werden. Durch Verwendung von regioisomeren Testverbindungen lassen sich die beschriebenen Tests auch zur Identifizierung von Hydrolase-Mutanten mit verbesserter Regioselektivität einsetzen. Anstelle von Hydrolase-Mutanten können auch andere Katalysatoren eingesetzt werden, um die Stereo- oder Regioselektivität zu bestimmen.

Der Test auf Enantioselektivität der nach dem beschriebenen Verfahren hergestellten Hydrolase-Mutanten kann auch durch kapillar-elektrophoretische Trennung erfolgen unter Verwendung von chiral modifizierten Kapillaren, die eine direkte Trennung der enantiomeren Substrate bzw. Produkte der Hydrolase-katalysierten Testreaktion ermöglichen. Hierzu können die Testsubstrate als Racemat eingesetzt werden. Die Trennung kann sowohl in Kapillaren erfolgen als auch unter Verwendung von präparierten Mikrochips, die eine elektrophoretische Trennung und Parallelisierung der Analysen zum Zwecke eines hohen Probendurchsatzes ermöglichen. Voraussetzung ist in beiden Fällen, daß die Enantiomeren kapillarelektrophoretisch trennbar sind.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele und Figuren näher erläutert.

Fig. 1 zeigt die experimentell erhaltenen Meßkurven zur Bestimmung der apparenten Enantioselektivität (E_{app}) bei der Hydrolyse von (R)- bzw. (S)-2-Methyldecansäure-p-nitrophenylester mit Kulturüberständen der Lipase-Mutanten P1B 01-E4, P2B 08-H3, P3B 13-D10, P4B 04-H3, P5B 14-C11,

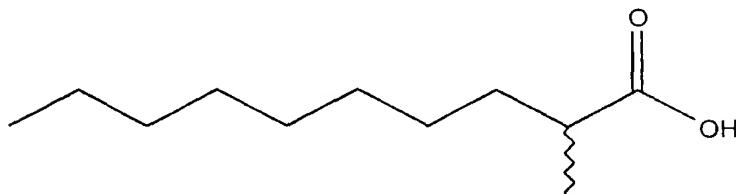
P4BSF 03-G10 und der Wildtyp-Lipase aus *P. aeruginosa* (die Steigerungen haben die Einheit [mOD/min]).

Fig. 2: Vergleich der DNA-Sequenzen der Lipase-Mutanten P1B 01-H1, P1B 01-E4, P2B 08-H3, P3B 13-D10, P4B 04-H3, P5B 14-C11 und P4BSF 03-G10 S155F mit der Sequenz des Wildtyps von Lipase aus *P. aeruginosa* (die mutierten Basen relativ zum Wildtyp sind eingerahmt, der Start der reifen Lipase-Mutanten liegt bei Base 163 bzw. bei Base 162 beim Wildtyp).

Beispiel 1

Im folgenden Beispiel wurde das Gen der Lipase aus *P. aeruginosa* (Isolierung nach K.-E. Jäger, Ruhr-Universität Bochum) für eine Optimierung herangezogen. Das Substrat, auf das hin die Enantioselektivität der Lipase verbessert werden sollte, war (R,S)-2-Methyldecansäure. Es sollte eine Lipase-Mutante entwickelt werden mit einer Präferenz für das (S)-Enantiomer. Der Screening-Test wurde mit (R)- bzw. (S)-2-Methyl-decan-säure-p-nitrophenylester durchgeführt.

Formel 5



(R,S)-2-Methyldecansäure

Bakterienstämme

E. coli JM109:

e14-(McrA), *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17(r_K-m_K⁺)*, *supE44*, *relA1*, Δ (*lac-proAB*), [*F' tra* Δ 36 *proAB lacI^q Z* Δ M15] (Fa. Stratagene)

P. aeruginosa PABST7.1:

lacUV5/lacI^q reguliertes T7-Polymerasegen stabil in das Chromosom des Stamm *P. aeruginosa* PABS integriert, der eine Deletion im Strukturgen der Lipase *lipA* trägt (K.-E. Jaeger *et al.* *J. Mol. Cat. Part B*, 1997, in press)

Plasmide

pMut5: *BamHI/ApaI* Fragment (1046 Bp) des *P. aeruginosa* Lipasegens *lipA* im Vektor pBluescript KSII (Fa. Stratagene)

pUCPL6A: *BamHI/HindIII* Fragment (2,8 KBp), welches das *P. aeruginosa* Lipase-Operon umfaßt, im Vektor pUCPKS (Watson *et al.*, *Gene* 1996, 172, 163) unter der Kontrolle des T7-Promotors

Kultivierung von Bakterien

E. coli JM109 wird über Nacht (16h) bei 37°C in 5 ml LB Medium auf einem Reagenzglasroller angezogen. Für *P. aeruginosa* PABST7.1 wird dem Medium 1mM IPTG zugesetzt. Für den Screening-Test wird *P. aeruginosa* PABST7.1 in Mikrotiterplatten auf einem Rundschüttler angezogen, wobei das Kulturvolumen 200 µl beträgt und die Inkubation auf 36-48h verlängert wird. Antibiotika werden in folgenden Konzentrationen zugegeben:

E. coli JM109: Ampicillin 100 µg/ml; *P. aeruginosa* PABST7.1: Carbenicillin 200 µg/ml, Tetrazyklin 50 µg/ml

Mutagenisierende PCR

Das Lipasegen *lipA* wird unter Verwendung des durch Endonuclease *Xmn* I linearisierten Plasmids pMut5 als Matrize und folgender PCR-Primer amplifiziert:

A :5'-GCGCAATTAAACCCCTCACTAAAGGGAACAAA-3';
B :5'-GCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAA-3'

Nach Reinigung des PCR-Produktes mittels einer Qiagen Qiaquick Column® dient es als Template in einer mutagenen PCR-Reaktion. Die Reaktionsbedingungen sind wie folgt: ein 100 µl Reaktionsvolumen enthält 16,6 mM (NH₄)₂SO₄; 67 mM Tris-HCl (pH 8.8); 6,1 mM MgCl₂; 6,7 µM EDTA (pH 8.0); 0,2 mM dNTPs; 10 mM Mercaptoethanol; 10 µl DMSO; je 10 pmol der Primer; 0,1 ng Template-DNA und 1U Taq-Polymerase (Goldstar, Fa. Eurogentec). Das Reaktionsvolumen wird mit 100 µl Paraffin überschichtet. Es wurden 10 parallele Reaktionen durchgeführt, die nach Reaktionsende vereinigt wurden. Das Zyklus-Protokol ist wie folgt: Nach einer 2 min Denaturierung bei 98°C, folgen 25 Zyklen mit 1 min 94°C, 2 min 64°C 1 min 72°C auf einem Robocycler 40 (Fa. Stratagen), gefolgt von einer 7 min Inkubation bei 72°C. Die Taq-Polymerase wird nach der Denaturierung des 1. Zyklus zugesetzt. Die Sequenzierung der PCR-Produkte ergibt eine Fehlerrate von ca. 1-2 Basenaustauschen pro 1000 Bp.

Klonierung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte werden mit Ethanol gefällt und in *A. dest* resuspendiert. Nach Restriktion mit *Apal* und *BamHI* wird das entstandene 1046 Bp Fragment mittels einer Qiagen Qiaquick Column® gereinigt und unter Verwendung von T4-DNA Ligase (Fa. MBI Fermentas) für 2h bei RT in den entsprechend vorbereiteten Vektor pUCPL6A ligiert. Das Reaktionsvolumen wird 1:5 verdünnt und in 200 µl kompetenter Zellen von *E. coli* JM109, die nach der Methode von *Hanahan* (*J. Mol. Biol.* 1983, 166, 557) präpariert werden, transformiert. Dazu werden DNA und Zellen für 1h auf Eis gelagert, 2 min bei 42°C und nach Zugabe von 700 µl LB-Medium 45 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellsuspension wird anschließend auf LB (Ampicillin 100 µg/ml) Platten ausplattiert. 60 ng des PCR-Produktes, die in die Ligationsreaktion eingesetzt werden, erbringen ca. 1500 Kolonien. Alle Kolonien werden in sterilem LB-Medium resuspendiert, die Plasmid DNA gereinigt und durch Elektroporation nach der Me-

thode von *Farinha* und *Kropinski* (*FEMS Microbiol. Lett.* 1990, 70, 221) in *P. aeruginosa* PABST7.1 transformiert. Die 96 Tröge der Mikrotiterplatten werden mit jeweils einer Kolonie inkuliert und wie im Abschnitt "Kultivierung von Bakterien" beschrieben behandelt. Zur Gewinnung des Kulturüberstandes, der anschließend im Test auf Stereoselektivität eingesetzt wird, werden die Mikrotiterplatten 30 min bei 4000 Upm zentrifugiert.

Test auf Stereoselektivität

Die durch Zentrifugation gewonnenen Lipase-haltigen Kulturüberstände werden in jeweils zwei gleichen Aliquots in benachbarte Tröge einer Mikrotiterplatte pipettiert. Das Testvolumen beträgt 100 µl und setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen (Tabelle 2):

Tabelle 2

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den Test auf verbesserte Enantioselektivität von Lipase-Mutanten

(R)-Ansatz	(S)-Ansatz
50 µl Kulturüberstand	50 µl Kulturüberstand
40 µl 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,5	40 µl 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,5
10 µl Substratlösung [10 mg / ml (R)-2-Methyldecansäure-p-nitrophenylester in DMF]	10 µl Substratlösung [10 mg / ml (S)-2-Methyldecansäure-p-nitrophenylester in DMF]

Nach der Zugabe des Tris/HCl-Puffers zu den Überständen wird die Mikrotiterplatte ca. 5 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wird nach Addition der Substratlösung spektrophotometrisch bei 410 nm und 30 °C kontinuierlich 10 min lang verfolgt. Aus dem linearen Anstieg der Absorptionskurve, die ein Maß für die konstante Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse ist, wird die apparente Enantioselektivität (E_{app}) bestimmt. Dazu werden die gemessenen Steigungen im linearen Bereich der Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen des Enantiomerenpaares dividiert und man erhält den Wert für die apparente Enantioselektivität der entsprechenden Lipase-Mutante.

Bestimmung der Stereoselektivität durch Gaschromatographie

Ausgewählte positive Klone werden in 5 ml -Flüssigkulturen (LB-Medium) angezogen und der Lipase-haltige Überstand nach Zentrifugation und Entfernung des Bakterien-Pellets zur Reaktion eingesetzt. Als Substrat werden 100 µl einer Lösung von racemischem (R,S)-2-Methyldecansäure-p-nitrophenylester (10 mg/ml in Dimethylformamid) eingesetzt. Diese wird mit 700 µl 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 versetzt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 µl Kulturüberstand gestartet und bei 30°C und 1000 rpm in Eppendorf-Reaktionsgefäßchen durchgeführt. Nach 2,5 h werden jeweils 200 µl Proben entnommen und in ein mit 200 µl Dichlormethan gefülltes Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 25 µl 20 %iger Salzsäure werden Produkte und Edukt extrahiert (Vortex-Schüttler, 1 min). Die organische Phase wird schließlich zur gaschromatographischen Analyse (GC) eingesetzt. Dabei wird eine Trennung der Enantiomere der freien 2-Methyldecansäure erzielt.

Trennbedingungen der GC:

Instrument:	Hewlett Packard 5890
Säule:	25 m 2,6 DM 3 Pent β-CD / 80% SE 54
Detector:	FID
Temperatur:	230°C Inlet; 80-190°C mit 2°C / min
Gas:	0,6 bar H ₂
Probenmenge:	0,1 ml

Ergebnisse (1. Zyklus)

Von ca. 1000 untersuchten Klonen, die durch *mutagenisierende PCR* mit der Ausgangs-DNA (Wildtyp-Gen von Lipase aus *P. aeruginosa*) erhalten wurden, wurden 12 mit verbesserter Enantioselektivität gegenüber dem entsprechenden Wildtyp-Enzym identifiziert. 3 Klone wurden schließlich ausgewählt und deren Enantioselektivität durch GC-Analyse bestimmt.

Tabelle 3

Ausgewählte Lipase-Mutanten mit verbesserter Enantioselektivität
(1. Zyklus)

Mutante	V _{app} (S) [mOD/min]	V _{app} (R) [mOD/min]	E _{app} ¹⁾	% ee (nachGC) /% Umsatz	E-Wert ²⁾ (berechnet nach GC)
Wildtyp	21,8	14,9	1,5	2,4 / 15,3	1,1
P1B 01-E4	128,4	43,2	3,0	36,1 / 23,2	2,4
P1B 01-F12	78,8	35,7	2,2	14,1 / 30,5	1,4
P1B 01-H1	158,7	56,2	2,8	37,6 / 4,5	2,2

¹⁾ E_{app} = V_{app}(S) / V_{app}(R)

²⁾ E = ln[1-c(1+ee_P)] / ln[1-c(1-ee_P)] mit c = Umsatz, ee_P = ee-Wert des Produktes

Die DNA des Klons P1B 01-E4 diente als Ausgangspunkt für eine neue PCR-Mutagenisierungsrounde. Dazu wurde das Plasmid pUCPL6A aus dem Klon isoliert und wie oben beschrieben nach *E. coli* JM109 transformiert. Nach Präparation der Plasmid-DNA wurde das 1046 Bp große Fragment durch Restriktion mit *Apal* und *BamH1* und anschließender Reinigung gewonnen und in das entsprechend vorbereitete Plasmid pMut5 ligiert. Nach Transformation und Plasmidisolierung diente dieses Plasmid als template-DNA in einer *mutagenisierenden PCR*-Reaktion unter den oben beschriebenen Bedingungen. Die gewonnene DNA der *mutagenisierenden PCR* diente zur Herstellung einer neuen Mutantenbibliothek (2. Generation).

Ergebnisse (2. Zyklus)

Aus der Mutantenbibliothek der 2. Generation wurden ca. 2200 Klone zum Screening-Test herangezogen. Dabei wurden 10 Mutanten mit einer gegenüber der Mutante P1B 01-E4 verbesserten Enantioselektivität identifiziert. 2 Mutanten (P2B 04-G11 und P2B 08-H3) wurden per GC-Analyse genauer untersucht.

Tabelle 4

Ausgewählte Lipase-Mutanten mit verbesserter Enantioselektivität
(2. Zyklus)

Mutante	$V_{app}(S)$ [mOD/min]	$V_{app}(R)$ [mOD/min]	E_{app} ¹⁾	% ee (nachGC) / % Umsatz	E-Wert ²⁾ (berechnet nach GC)
P2B 04-G11	224,9	52,3	4,3	47,8 / 30,0	3,4
P2B 08-H3	310,8	67,4	4,6	56,6 / 19,3	4,1

1) $E_{app} = V_{app}(S) / V_{app}(R)$

2) $E = \ln[1-c(1+ee_p)] / \ln[1-c(1-ee_p)]$ mit $c = \text{Umsatz}$, $ee_p = \text{ee-Wert des Produktes}$

Der Klon P2B 08-H3 wurde für die nächste Mutationsrunde (3. Generation) eingesetzt.

Ergebnisse (3. Zyklus)

Aus der Mutantenbibliothek der 3. Generation wurden ca. 2400 Klone zum Screening-Test herangezogen. Dabei wurde 1 Mutante (P3B 13-D10) mit einer gegenüber der Mutante P2B 08-H3 verbesserten Enantioselektivität identifiziert. Diese wurde durch GC-Analyse weiter untersucht.

Tabelle 5

Ausgewählte Lipase-Mutanten mit verbesserter Enantioselektivität
(3. Zyklus)

Mutante	$V_{app}(S)$ [mOD/min]	$V_{app}(R)$ [mOD/min]	E_{app} ¹⁾	% ee (nachGC) / % Umsatz	E-Wert ²⁾ (berechnet nach GC)
P3B 13-D10	240,0	35,2	6,9	74,8 / 34,6	10,2

1) $E_{app} = V_{app}(S) / V_{app}(R)$

2) $E = \ln[1-c(1+ee_p)] / \ln[1-c(1-ee_p)]$ mit $c = \text{Umsatz}$, $ee_p = \text{ee-Wert des Produktes}$

Ergebnisse (4. Zyklus)

Aus der Mutantenbibliothek der 4. Generation wurden ca. 2000 Klone zum Screening-Test herangezogen. Dabei wurden 4 Mutanten mit einer gegenüber der Mutante P3B 13-D10 verbesserten Enantioselektivität identifiziert. Diese wurde durch GC-Analyse weiter untersucht.

Tabelle 6

Ausgewählte Lipase-Mutanten mit verbesserter Enantioselektivität
(4. Zyklus)

Mutante	V _{app} (S) [mOD/min]	V _{app} (R) [mOD/min]	E _{app} ¹⁾	% ee (nachGC) /% Umsatz	E-Wert ²⁾ (berechnet nach GC)
P4B 04-H3	355,6	26,5	13,4	81,0 / 20,0	11,2
P4B 01-F2	162,4	13,8	11,7	82,1 / 5,0	10,6
P4B 15-G1	315,4	28,1	11,2	80,0 / 18,0	10,7
P4B 15-H7	288,0	25,1	11,5	78,4 / 22,0	10,2

1) $E_{app} = V_{app}(S) / V_{app}(R)$

2) $E = \ln[1-c(1+ee_p)] / \ln[1-c(1-ee_p)]$ mit $c = \text{Umsatz}$, $ee_p = \text{ee-Wert des Produktes}$

Der Klon P4B 04-H3 wurde für die nächste Mutationsrunde (5. Generation) eingesetzt.

Ergebnisse (5. Zyklus)

Aus der Mutantenbibliothek der 5. Generation wurden ca. 5200 Klone zum Screening-Test herangezogen. Dabei wurden 2 Mutanten mit einer gegenüber der Mutante P4B 04-H3 verbesserten Enantioselektivität identifiziert. Diese wurde durch GC-Analyse weiter untersucht.

Tabelle 7

Ausgewählte Lipase-Mutanten mit verbesserter Enantioselektivität
(5. Zyklus)

Mutante	V _{app} (S) [mOD/min]	V _{app} (R) [mOD/min]	E _{app} ¹⁾	% ee (nachGC) /% Umsatz	E-Wert ²⁾ (berechnet nach GC)
P5B 14-C11	275,9	17,3	15,9	77,0 / 43,0	13,7
P5B 08-F2	124,0	8,7	14,3	79,7 / 40,3	15,1

¹⁾ E_{app} = V_{app}(S) / V_{app}(R)

²⁾ E = $\ln[1-c(1+ee_p)] / \ln[1-c(1-ee_p)]$ mit c = Umsatz, ee_p = ee-Wert des Produktes

Sequenzierung der positiven Mutanten

Durch Sequenzierung der positiven Mutanten konnten die Mutationen in den Lipase-Genen lokalisiert werden (siehe Figur 2). Nach Zuordnung der Basentriplets zu den entsprechenden Aminosäuren ergeben sich gegenüber der Wildtyp-Lipase aus *P. aeruginosa* folgende Aminosäure-Austausche :

P1B 01-H1: T103I (Thr103 → Ile103), S149G (Ser149 → Gly149)
 P1B 01-E4: S149G (Ser149 → Gly149)
 P2B 08-H3: S149G (Ser149 → Gly149), S155L (Ser155 → Leu155)
 P3B 13-D10: S149G (Ser149 → Gly149), S155L (Ser155 → Leu155),
 V47G (Val47 → Gly47)
 P4B 04-H3: S149G (Ser149 → Gly149), S155L (Ser155 → Leu155),
 V47G (Val47 → Gly47), S33N (Ser33 → Asn33), F259L
 (Phe259 → Leu259)
 P5B 14-C11: S149G (Ser149 → Gly149), S155L (Ser155 → Leu155),
 V47G (Val47 → Gly47), S33N (Ser33 → Asn33), F259L
 (Phe259 → Leu259), K110R (Lys110 → Arg110)

Die Mutanten P1B 01-E4, P2B 08-H3 und P3B 13-D10 wurden unter den Bezeichnungen DSM 11 658, DSM 11 659 und DSM 11 659 am 16.07.1997 bei der DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

und Zellkulturen GmbH, D-38124 Braunschweig, Mascheroder Weg 1b, hinterlegt.

Die Mutanten P5B 14-C11 und P4B 04-H3 wurden unter den Bezeichnungen DSM 12 320 und DSM 12 322 am 20.07.1998 bei der DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38124 Braunschweig, Mascheroder Weg 1b, hinterlegt.

Beispiel 2

Die Vorschriften zur Kultivierung der Bakterien, der *mutagenisierenden PCR* sowie des Testverfahrens auf Enantioselektivität sind analog zu Beispiel 1. Die Herstellung umfangreicher Mutantenbibliotheken erfolgt in diesem Beispiel jedoch durch *in vitro*-Rekombination.

Die für die *in vitro*-Rekombination verwendete DNA wird entweder durch *mutagenisierende PCR* generiert oder durch Vereinigung der DNA aus einer beliebigen Anzahl von Klonen aus einer oder mehreren, durch wiederholte *mutagenisierende PCR* entstandenen Generationen an Klonen gewonnen. Wenn die PCR-Produkte einer *mutagenisierenden PCR* Ausgangspunkt zur Gewinnung von DNA für die *in vitro*-Rekombination waren, wird wie folgt verfahren: Die PCR-Produkte der *mutagenisierenden PCR* (siehe Beispiel 1) werden gereinigt, mit den Restriktionsendonukleasen *Apa* I und *BamH* I geschnitten, in den entsprechend geschnittenen Vektor pMUTS ligiert und anschließend nach *E. coli* JM 109 transformiert. Die Plasmid-DNA aus allen Transformationsklonen wird isoliert. War eine beliebige Anzahl ausgewählter Klone einer oder verschiedener Generationen an Mutantenklonen Ausgangspunkt für die Gewinnung von DNA für die *in vitro*-Rekombination, so wird die Plasmid-DNA des Vektors pMUT5 mit den jeweiligen Varianten des Lipasegens von *P. aeruginosa* isoliert und vereinigt. In beiden Fällen wird wie folgt weiter verfahren: Durch Restriktion mit der Endonuklease *Pvu* II wird ein 1430 Bp großes Fragment gewonnen, das neben den Strukturgenen für die Lipase von *P. aeruginosa* die Bindestellen der schon in der *mutagenisierenden PCR* verwendeten Primer A und B umfaßt. Dieses Fragment wird gereinigt und durch Inku-

bation mit Desoxyribonuclease I (DNase I aus *Rinder-Pankreas*) in zufällig generierte Fragmente geteilt. Dabei kann die Größe der Fragmente sowie die Fehlerrate der sich anschließenden Reassemblierung durch Wahl der Inkubationsbedingungen beeinflußt werden.

DNAse I Behandlung:

In einem Gesamtvolumen von 100 µl werden 3 µg *Pvu* II-Fragmente in 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂ bzw. 10 mM MnCl₂ und 50 µg/ml BSA für 10-25 min bzw. 1-10 min bei 23 °C mit 0,075 U DNase I inkubiert. Die Reaktion wird durch 10 minütige Inkubation bei 93 °C terminiert. In Abhängigkeit von der Reaktionsdauer entstehen hierbei Fragmente von kleiner 500 Bp bis kleiner 10 Bp. Für den Fall, daß nur ein bestimmter Größenbereich verwendet wird, können diese Fragmente durch selektiven Elektrotransfer auf DEAE-Membran aus Agarosegelen gewonnen werden (nach F.M. Ausubel, et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, 1989). Nach Reinigung der Fragmente durch das Qiagen Nucleotide Removal Kit® (Fa. Qiagen) wird die nachfolgende Reassemblierungsreaktion durchgeführt.

Reassemblierungsreaktion

10-30 ng der aus der DNase I-Restriktion stammenden Fragmente werden in 75 mM Tris/HCl pH 9.0, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% (w/v) Tween® 20, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs mit 2U Goldstar Taq-Polymerase (Fa. Eurogentec) in einem Gesamtvolumen von 50 µl folgendem PCR-Programm unterzogen: 2 min 94 °C, 40 Zyklen mit 1 min 94 °C, 2 min 52 °C und 1 min 72 °C abschließend 7 min 72 °C. Die Taq-Polymerase wird nach dem 1 minütigen Denaturierungsschritt des 1. Zyklus zugegeben.

PCR

1 µl aus der Reassemblierungsreaktion wird in eine sich anschließende PCR-Reaktion eingesetzt, die sich mit folgenden Unterschieden, wie für die Reassemblierungsreaktion beschrieben, zusammensetzt: anstelle der

DNAse I-generierten Fragmente wird 1 μ l der Reassemblierungsreaktion als Matrizen-DNA eingesetzt. Zusätzlich werden die Primer A und B in einer Konzentration von 0,2 mM sowie 10 % Dimethylsulfoxid zugesetzt. Das Zyklenprotokoll lautet wie folgt:

2 min 98 °C, 30 Zyklen zu 1 min 94 °C, 2 min 64 °C, 1 min 72 °C und abschließend 7 min 72 °C; Es werden Parallelansätze durchgeführt. Die in diesen Reaktionen entstandenen PCR-Produkte werden gereinigt, mit den Restriktionendonukleasen Apa I und Bam HI restringiert und wie im Abschnitt "mutagenisierende PCR" von Beispiel 1 beschrieben kloniert.

Ergebnisse (*in vitro*-Rekombination):

Es wurden 12 Klone aus der 1. Generation der durch *mutagenisierende PCR* erhaltenen Mutantenbibliothek (siehe Beispiel 1) für die *in vitro*-Rekombination eingesetzt. Folgende Klone, die im Screening-Test verbesserte Enantioselektivität gezeigt hatten, wurden benutzt:

P1B 01-A2, P1B 01-A6, P1B 01-D2, P1B 01-D5, P1B 01-E1, P1B 01-E4, P1B 01-F3, P1B 01-F11, P1B 01-H1, P1B 01-H3, P1B 01-F12.

Die nach der oben beschriebenen Vorgehensweise rekombinierte DNA dieser Klone wird wie im Abschnitt "mutagenisierende PCR" angegeben kloniert und die Kulturüberstände zum Test auf Enantioselektivität eingesetzt. Es wurden ca. 1000 rekombinante Klone getestet. Die beiden identifizierten Rekombinanten S2A 01-E11 und S2A 02-G3 zeigen gegenüber der besten Mutante der 1. Generation (P1B 01-E4) aus Beispiel 1 eine signifikante Verbesserung der Enantioselektivität.

Tabelle 8

Ausgewählte Lipase-Mutanten mit verbesserter Enantioselektivität (*in vitro*-Rekombination)

Mutante	$V_{app}(S)$ [mOD/min]	$V_{app}(R)$ [mOD/min]	E_{app} ¹⁾	% ee (nachGC) /% Umsatz	E-Wert ²⁾ (ber. nach GC)
S2A 01-E11	145,6	41,6	3,5	41,0 / 27,0	2,8
S2A 02-G3	210,8	62,0	3,4	38,0 / 23,0	2,5

1) $E_{app} = V_{app}(S) / V_{app}(R)$

2) $E = \ln[1-c(1+ee_p)] / \ln[1-c(1-ee_p)]$ mit $c = \text{Umsatz}$, $ee_p = \text{ee-Wert des Produktes}$

Beispiel 3

Ortsgerichtete Sättigungs mutagenese an der Aminosäure-Position 155 der Lipase-Mutante P3B 13-D10:

Plasmide:

pMut5 13D10: BamHI/Apal Fragment (1046Bp) des Gens der Mutante P3B 13D10 der Lipase von *P. aeruginosa* in pBluescript KS II

pMut5ΔAK 13D10: Deletion des AflIII/KpnI Fragmentes in pMut5 13D10

Ein Fragment des Gens der Lipase der Mutante P3B 13D10 wird unter Verwendung des durch die Endonuclease XmaI linearisierten Plasmids pMut5 13D10 und folgender PCR-Primer amplifiziert:

A: 5'-GCGCAATTAAACCCTCACTAAAGGGAACAAA-3'
M: 5'-GGTACGCAGAATNNNCTGGGCTCGC-3'

N steht dabei für A oder C oder G oder T.

Die Reaktionsbedingungen sind dabei wie folgt: ein 50 µl Reaktionsvolumen enthält 75 mM Tris/HCl pH9.0 (bei 25 °C); 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,5 mM MgCl_2 ; 0,01% (w/v) Tween® 20; 10% (v/v) DMSO; je 10 pmol der Primer; 0,1 ng der Template-DNA und 2U Taq-Polymerase (Goldstar, Fa. Eurogentec). Das Zyklenprotokol ist wie folgt: Nach 2 min Denaturierung bei 98 °C folgen 30 Zyklen mit 1 min 94 °C, 2 min 64°C, 1 min 72 °C auf

einem Robocycler 40 (Fa. Stratagene), gefolgt von 7 min Inkubation bei 72 °C. Die Taq-Polymerase wird nach der Denaturierung des 1. Zyklus zugesetzt. Nach Reinigung der PCR-Produkte mittels Agarosegel-elektrophorese und Elution der DNA aus dem Agarosegel unter Verwendung des Nucleospin Extrakt-Kits (Macherey & Nagel) diente diese als Primer (so genannter Megaprimer) in einer nachfolgenden PCR. Dazu wird das Lipasegen auf dem durch die Endonuclease XmnI linearisierten Plasmid pMut5ΔAK 13D10 unter Verwendung folgender PCR primer und den oben beschriebenen Reaktionsbedingungen amplifiziert:

A: 5'-GCGCAATTAAACCCCTCACTAAAGGGAACAAA-3'
B (Megaprimer): 5'GCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAA-3'

Die Reaktionbedingungen und das Zyklenprotokoll sind wie oben beschrieben mit dem Unterschied, daß dem Reaktionansatz 1-10 ng des Megaprimer zugesetzt werden. Die Klonierung der PCR-Produkte erfolgt wie unter Klonierung der PCR-Produkte beschrieben.

Ergebnisse (Sättigungsmutagenese 3. Generation, P3B13-D10)

Aus der Mutantenbibliothek der Sättigungsmutagenese (3. Generation, P3B 13-D10) wurden ca. 900 Klone zum Screening-Test herangezogen. Dabei wurde 1 Mutante (P4BSF 03-G10) mit einer gegenüber der Mutante P3B 13-D10 verbesserten Enantioselektivität identifiziert. Diese wurde durch GC-Analyse weiter untersucht.

Tabelle 9

Ausgewählte Lipase-Mutante mit verbesserter Enantioselektivität
(3. Generation, P3B 13-D10)

Mutante	$V_{app(S)}$ [mOD/min]	$V_{app(R)}$ [mOD/min]	E_{app} ¹⁾	% ee (nachGC) /% Umsatz	E-Wert ²⁾ (berechnet nach GC)
P4BSF	3 84,7	25,3	15,2	87,3 / 19,0	20,4
03-G10					

¹⁾ $E_{app} = V_{app(S)} / V_{app(R)}$

²⁾ $E = \ln[1-c(1+ee_p)] / \ln[1-c(1-ee_p)]$ mit c = Umsatz, ee_p = ee-Wert des Produktes

Sequenzierung der positiven Mutanten

Durch Sequenzierung der positiven Mutanten konnten die Mutationen im Lipase-Gen lokalisiert werden (siehe Figur 2). Nach Zuordnung der Basentriplets zu der entsprechenden Aminosäure ergab sich gegenüber der Mutante P3B 13-D10 folgender Aminosäure-Austausch :

P4BSF 03-G10 : L155F (Leu155 → Phe155)

Die Mutante P4BSF 03-G10 wurde unter der Bezeichnung DSM 12 321 am 20.07.1998 bei der DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38124 Braunschweig, Mascheroder Weg 1b, hinterlegt.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung und Identifizierung von Hydrolase-Mutanten mit verbesserten Eigenschaften hinsichtlich Stereo- oder Regioselektivität, katalytischer Aktivität oder Stabilität, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) ein Ausgangs-Hydrolasegen mittels einer modifizierten Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mutagenisiert wird, wobei durch Einstellen der Mg^{2+} -, Mn^{2+} - und der Desoxynucleotid-Konzentrationen sowie der Einstellung der Zyklanzahl die Mutationsfrequenz und Gesamtanzahl der Mutationen in der amplifizierten DNA eingestellt wird und/oder
 - b) ein oder mehrere Ausgangs-Hydrolasegene, ein oder mehrere gemäß Schritt a) mutierte Hydrolasegene oder Gemische von einem oder mehreren Ausgangs-Hydrolasegenen und einem oder mehreren gemäß Schritt a) mutierten Hydrolasegenen durch enzymatische Fragmentierung dieser Gene und nachfolgender enzymatischer Reassemblierung der entstandenen Fragmente zu vollständig rekombinierten Hydrolasegenen mutagenisiert werden,
 - c) die gemäß Schritt a) oder b) erhaltenen mutierten Hydrolasegene in einen Wirtsorganismus transformiert werden und
 - d) Hydrolase-Mutanten mit verbesserten Eigenschaften, die von in Schritt c) erhaltenen Transformanten exprimiert werden, durch ein Testverfahren identifiziert werden.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt a) bei der PCR durch Einstellen der Mg^{2+} -, Mn^{2+} - und der Desoxynucleotid-Konzentration eine durchschnittliche Mutationsfrequenz von 1-2 Basenaustauschen bezogen auf das zu mutagenisierende Hydrolasegen eingestellt wird.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt a) als Ausgangs-Hydrolasegen ein in einer zuvor gemäß Anspruch 1 durchgeführten PCR mutagenisiertes Hydrolasegen eingesetzt wird.

4. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt b) die enzymatische Fragmentierung der Hydrolasegene mit einer Desoxyribonuclease durchgeführt wird.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt b) die Reassemblierung der Fragmente enzymatisch mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase unter Verwendung eines zyklischen Temperaturprogrammes, in welchem die Parameter Temperatur und Zyklendauer eingestellt werden, durchgeführt wird.
6. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt b) während der enzymatischen Reassemblierung durch Einstellen der Mg^{2+} -, Mn^{2+} - und der Desoxynucleotidkonzentration die Mutationsfrequenz eingestellt wird.
7. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt b) die vollständig rekombinierten Hydrolasegene nach Beendigung der Reassemblierungsreaktion durch eine Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert werden.
8. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt b) entweder aus Schritt a) gemäß Anspruch 1 oder 2 erhaltene modifizierte Hydrolasegene oder mehrere gemäß Anspruch 3 mutagenisierte Hydrolasegene der Fragmentierung und Reassemblierung unterworfen werden.
9. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt b) zur Reassemblierung zusätzlich synthetisch hergestellte Genfragmente eingesetzt werden.
10. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt b) zur Reassemblierung Hydrolasegen-Fragmente aus unterschiedlichen Organismen eingesetzt werden können, die eine Sequenzhomologie von mindestens 60% zueinander besitzen.
11. Verfahren gemäß Anspruch 2 oder 6, wobei die Hydrolase-Mutanten Lipase- oder Esterasemutanten sind und die Konzentration der Magnesium-Ionen 1,5 bis 8,0 mM, bevorzugt 5,8 bis 6,4 mM ist und die Konzentration der Mangan-Ionen 0,0 bis 3,0 mM, bevorzugt < 0,3 mM ist.

12. Verfahren gemäß Anspruch 2 oder 6, wobei die Hydrolase-Mutanten Lipase- oder Esterasemutanten sind und die Konzentration der Desoxynucleotidtriphosphate 0,05 mM bis 1,0 mM, bevorzugt 0,2 mM beträgt.

13. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt d) zum Test auf Stereo- oder Regioselektivität der Hydrolase-Mutanten ein Testsubstrat mit einer chromophoren Gruppe versehen ist, die nach der Abspaltung durch den Katalysator eine Änderung der Absorption oder Emission hervorruft, die spektrometrisch bestimmt wird und die reinen Stereo- oder Regiosomeren des Testsubstrates in getrennten Testgefäßen mit gleichen Mengen der Hydrolase-Mutanten versetzt werden und die Stereo- oder Regioselektivität aus dem Verhältnis der erhaltenen linearen Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen bestimmt werden kann.

14. Verfahren gemäß Anspruch 13, wobei als Testsubstrat die Stereo- oder Regiosomeren einer Verbindung mit einer über eine Carbonsäureester- oder Carbonsäureamid-Bindung gebundene, UV/VIS-aktive oder fluoreszenzaktive Molekülgruppe eingesetzt werden.

15. Verfahren gemäß Anspruch 14, wobei die UV/VIS-aktive Molekülgruppe ein p-Nitrophenyl-Rest ist.

16. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt d) der Test auf Stereo- oder Regioselektivität über die Bestimmung der zeitlichen Konzentrationsänderung von freien Fettsäuren oder Bernsteinsäure erfolgt, wobei die entsprechenden stereo- oder regiosomeren Carbonsäureester oder -amide mit Hilfe der Hydrolase-Mutanten in getrennten Gefäßen zu freien Fettsäuren oder Bernsteinsäure hydrolysiert werden.

17. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt d) der Test auf Stereo- oder Regioselektivität über die Messung der Radioaktivität erfolgt, wobei die Hydrolase-Mutanten mit in einer funktionellen Gruppe unterschiedlich

radioaktiv markierten Stereo- oder Regioisomeren umgesetzt werden und wobei das Gemisch der Stereo- oder Regioisomerenträgerfixiert ist.

18. Verfahren gemäß Anspruch 17, wobei eines der Stereo- oder Regioisomere des an den Träger gebundenen Gemisches der isomeren Verbindung mit dem Radioisotop ³H und das andere Stereoisomer mit dem Radioisotop ¹⁴C markiert ist.

19. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt d) der Test auf Stereoselektivität über die kapillarelektrophoretische Bestimmung der Reaktionsprodukte und -edukte einer Testreaktion erfolgt, wobei die Trennung der stereoisomeren Reaktionsprodukte und -edukte in chiral-modifizierten Kapillaren durchgeführt wird.

20. Verfahren gemäß Anspruch 13 bis 19, wobei mehrere Reaktionen parallel in Mikrotiterplatten durchgeführt werden.

21. Verfahren nach Anspruch 1, wobei in den in Schritt d) identifizierten Mutanten mit verbesserten Eigenschaften durch Sequenzierung die Position des Codons, das für die veränderte Aminosäure codiert, lokalisiert wird, nachfolgend mittels ortsgereichteter Sättigungsmutagenese einen Satz Hydrolasegene mit allen für diese Position möglichen Codons erzeugt wird, und die so erhaltenen mutierten Hydrolasegene analog Schritten c) und d) von Anspruch 1 weiterbehandelt werden.

22. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Lokalisierung der Position des Codons, das für die veränderte Aminosäure codiert, durch DNA-Sequenzierung erfolgt.

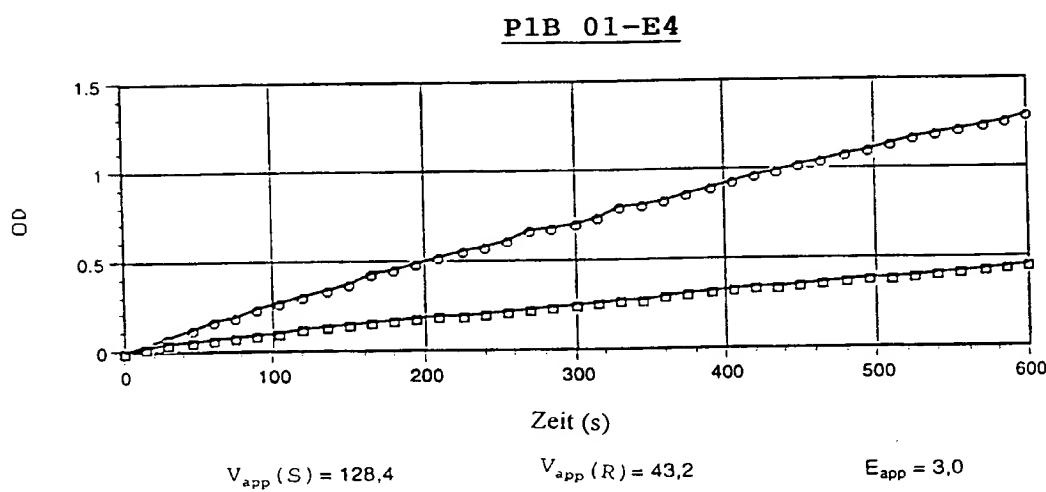
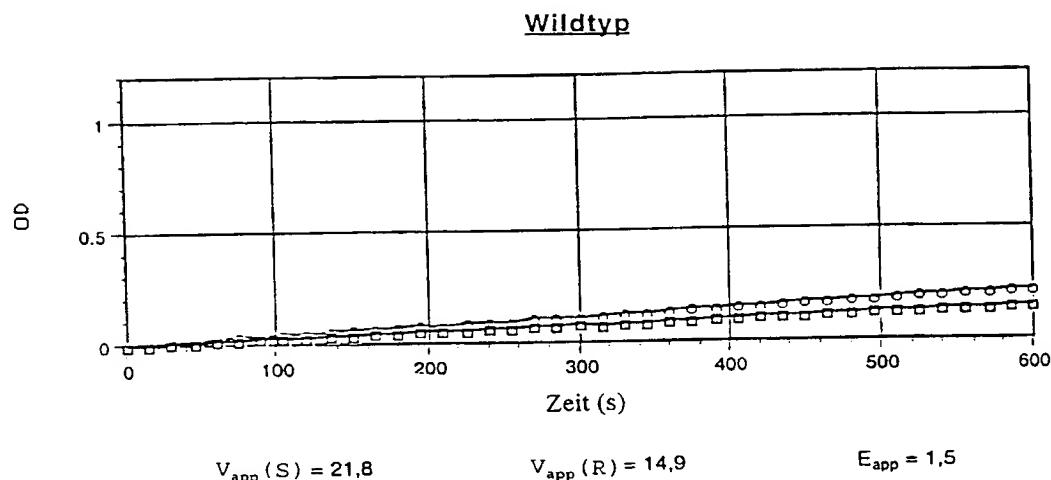
23. Hydrolase-Mutante erhältlich durch ein Verfahren gemäß einen oder mehreren der Ansprüche 1 bis 22.

24. Hydrolase-Mutante gemäß Anspruch 23, die eine Lipase-Mutante ist.

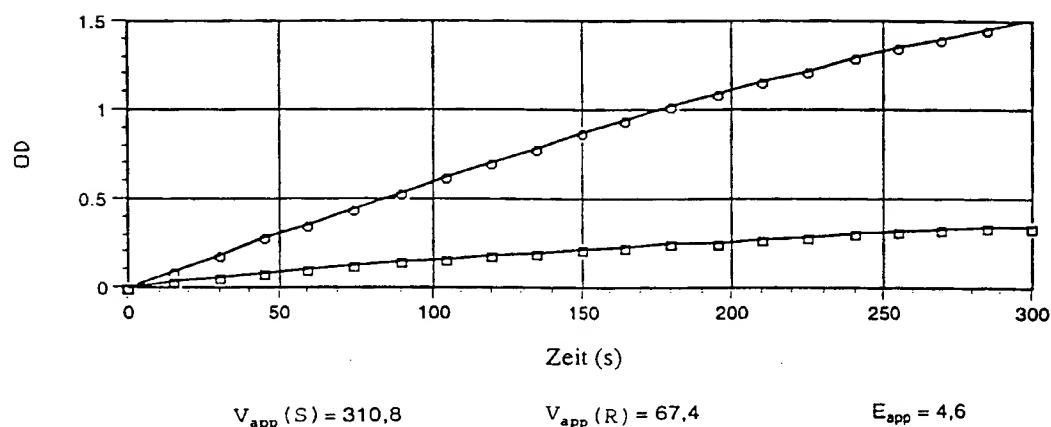
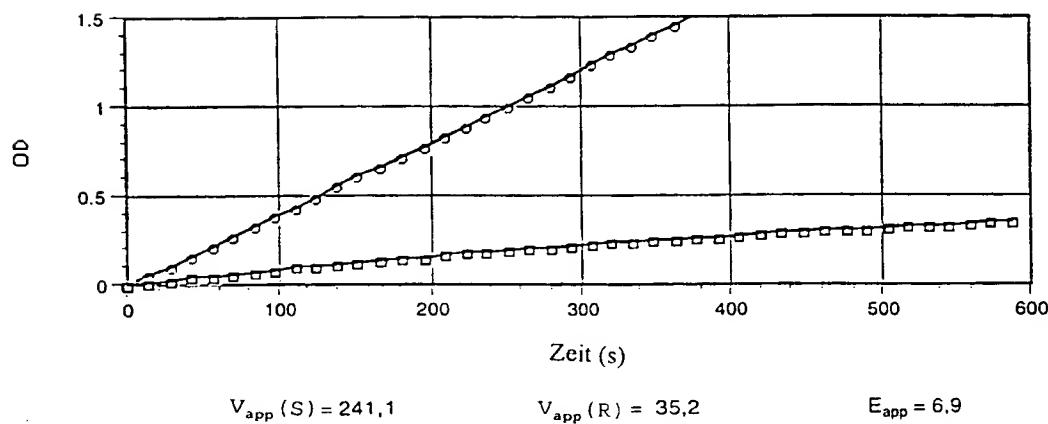
25. Hydrolase-Mutante gemäß Anspruch 23, die eine Esterase-Mutante ist.

26. Hydrolase-Mutante gemäß Anspruch 24, die eine Lipase-Mutante der Ausgangs-Lipase aus dem Stamm *P. aeruginosa* ist.
27. Hydrolase-Mutante gemäß Anspruch 26, die durch Expressieren der Transformanten P1B 01-E4 (DSM 11 658), P2B 08-H3 (DSM 11 659), P3B 13-D10 (DSM 11 660), P4B 04-H3 (DSM 12 322), P5B 14-C11 (DSM 12 320) oder P4BSF 03-G10 (DSM 12 321) erhältlich ist.
28. Hydrolase-Mutante gemäß Anspruch 24, die die Aminosäuresequenz der in SEQ ID NOs 4, 6, 8, 12, 14, 16 oder 18 gezeigten reifen Proteine aufweist.
29. DNA-Sequenz, die für eine Hydrolase-Mutante gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 23 bis 28 kodiert.
30. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 29, die eine in SEQ ID NOs 3, 5, 7, 11, 13, 15 oder 17 gezeigte DNA-Sequenz umfaßt.
31. Vektor, umfassend eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 29 oder 30.
32. Transformante, umfassend eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 29 oder 30 und/oder einen Vektor gemäß Anspruch 31.
33. Transformante gemäß Anspruch 32, die Transformante P1B 01-E4 (DSM 11 658), P2B 08-H3 (DSM 11 659), P3B 13-D10 (DSM 11 660), P4B 04-H3 (DSM 12 322), P5B 14-C11 (DSM 12 320) oder P4BSF 03-G10 (DSM 12 321) ist.
34. Verfahren zur Herstellung von Hydrolasemutanten mit verbesserten Eigenschaften, umfassend das Kultivieren einer Transformanten gemäß Anspruch 32 oder 33.
35. Verfahren zum Test von Katalysatoren auf Stereo- oder Regioselektivität, wobei ein Testsubstrat und die reinen Stereo- oder

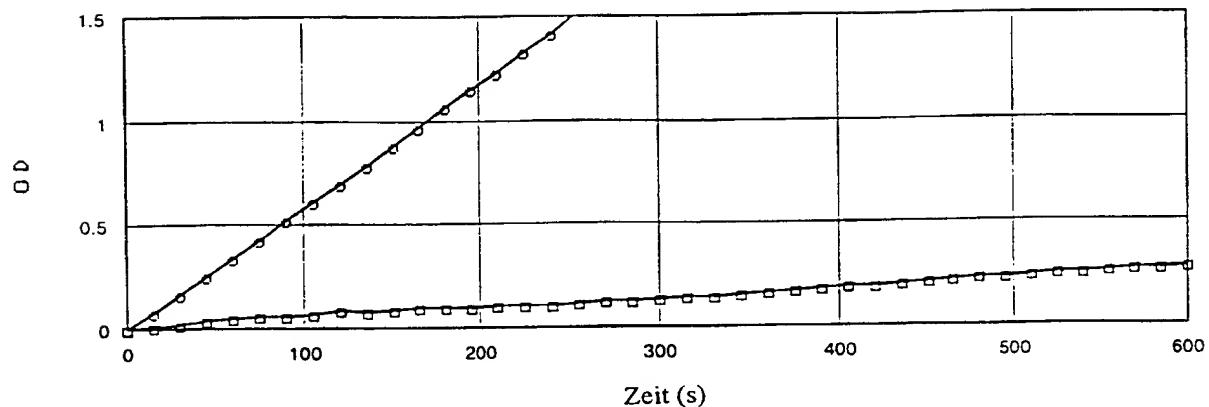
Regioisomeren des Testsubstrates, die mit einer chromophoren Gruppe versehen sind, die nach der Abspaltung durch den Katalysator eine spektrometrisch bestimmbar Änderung der Absorption oder Emission hervorruft, in getrennten Testgefäßen mit gleichen Mengen des Katalysators versetzt werden und die Stereo- oder Regioselektivität aus dem Verhältnis der erhaltenen linearen Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen bestimmt wird.

Fig. 1

2 / 13

P2B 08-H3P3B 13-D10

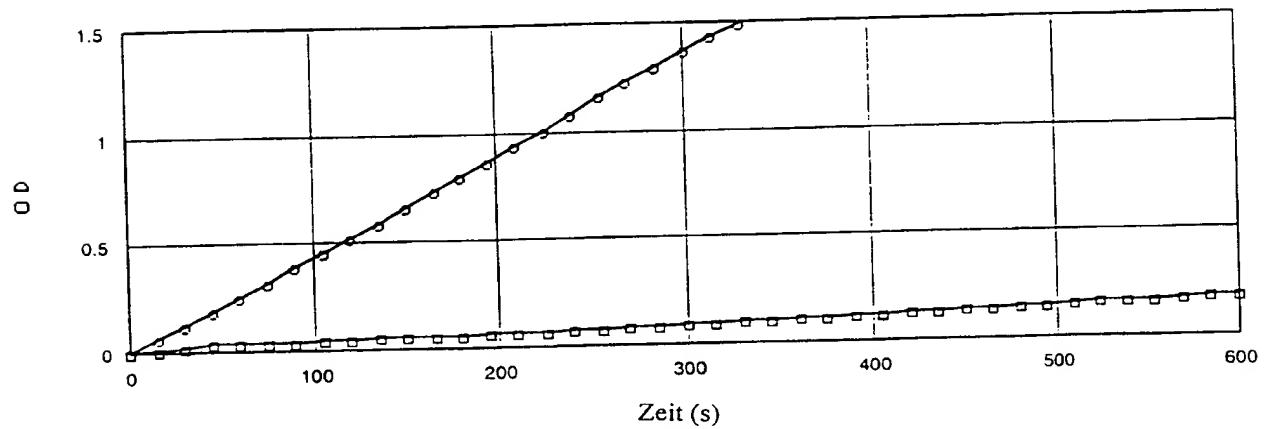
3 / 13

P4B 04-H3

$$V_{app} (S) = 355,6$$

$$V_{app} (R) = 26,5$$

$$E_{app} = 13,4$$

P5B 14-C11

$$V_{app} (S) = 275,9$$

$$V_{app} (R) = 17,3$$

$$E_{app} = 15,9$$

4 / 13

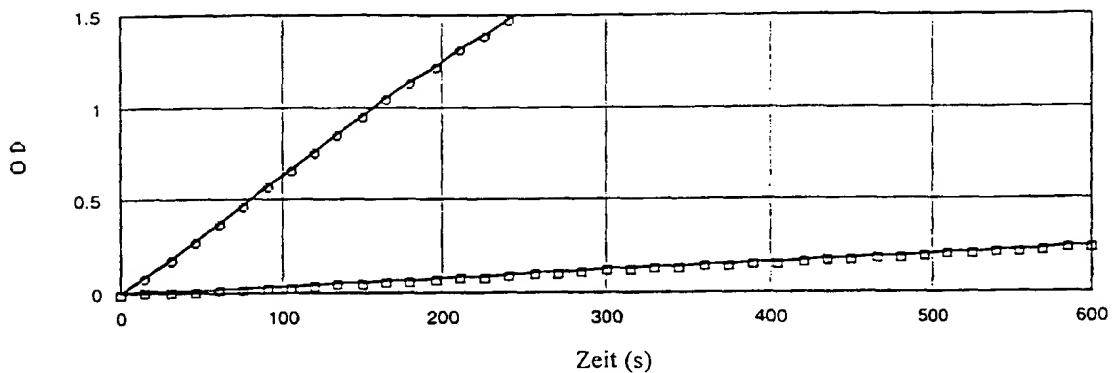
P4BSF 03 -G10 $V_{app} (S) = 384,7$ $V_{app} (R) = 25,3$ $E_{app} = 15,2$

Fig. 2

Wildtyp	10										
P1B 01-H1	G	G	A	T	C	C	C	C	G	G	19
P1B 01-E4	G	G	A	T	C	C	C	C	G	G	20
P2B 08-H3	G	G	A	T	C	C	C	G	G	G	20
P3B 13-D10	G	G	A	T	C	C	C	G	G	G	20
P4B 04-H3	G	G	A	T	C	C	C	G	G	G	20
P5B 14-C11	G	G	A	T	C	C	C	G	G	G	20
P4BSF 03-G10	G	G	A	T	C	C	C	G	G	G	20
20											
Wildtyp	30										
P1B 01-H1	A	A	G	G	A	T	T	C	G	G	39
P1B 01-E4	A	A	G	G	A	T	T	C	G	G	40
P2B 08-H3	A	A	G	G	A	T	T	C	G	G	40
P3B 13-D10	A	A	G	G	A	T	T	C	G	G	40
P4B 04-H3	A	A	G	G	A	T	T	C	G	G	40
P5B 14-C11	A	A	G	G	A	T	T	C	G	G	40
P4BSF 03-G10	A	A	G	G	A	T	T	C	G	G	40
40											
Wildtyp	50										
P1B 01-H1	G	C	A	G	G	A	C	G	G	C	59
P1B 01-E4	G	C	A	G	G	A	C	G	G	C	60
P2B 08-H3	G	C	A	G	G	A	C	G	G	C	60
P3B 13-D10	G	C	A	G	G	A	C	G	G	C	60
P4B 04-H3	G	C	A	G	G	A	C	G	G	C	60
P5B 14-C11	G	C	A	G	G	A	C	G	G	C	60
P4BSF 03-G10	G	C	A	G	G	A	C	G	G	C	60
60											
Wildtyp	70										
P1B 01-H1	C	C	A	T	C	A	A	C	T	G	79
P1B 01-E4	C	C	A	T	C	A	A	C	C	G	80
P2B 08-H3	C	C	A	T	C	A	A	C	C	G	80
P3B 13-D10	C	C	A	T	C	A	A	C	C	G	80
P4B 04-H3	C	C	A	T	C	A	A	C	C	G	80
P5B 14-C11	C	C	A	T	C	A	A	C	C	G	80
P4BSF 03-G10	C	C	A	T	C	A	A	C	C	G	80
80											
Wildtyp	90										
P1B 01-H1	C	A	A	C	A	T	G	A	G	A	99
P1B 01-E4	C	A	A	C	A	T	G	A	G	A	100
P2B 08-H3	C	A	A	C	A	T	G	A	G	A	100
P3B 13-D10	C	A	A	C	A	T	G	A	G	A	100
P4B 04-H3	C	A	A	C	A	T	G	A	G	A	100
P5B 14-C11	C	A	A	C	A	T	G	A	G	A	100
P4BSF 03-G10	C	A	A	C	A	T	G	A	G	A	100
100											
Wildtyp	110										
P1B 01-H1	T	G	C	T	C	C	C	C	T	G	119
P1B 01-E4	T	G	C	T	C	C	C	C	T	G	120
P2B 08-H3	T	G	C	T	C	C	C	C	T	G	120
P3B 13-D10	T	G	C	T	C	C	C	C	T	G	120
P4B 04-H3	T	G	C	T	C	C	C	C	T	G	120
P5B 14-C11	T	G	C	T	C	C	C	C	T	G	120
P4BSF 03-G10	T	G	C	T	C	C	C	C	T	G	120

	120	130	
Wildtyp	A T C G G T C T C G C C T C T C T C G C	139	
P1B 01-H1	A T C G G T C T C G C C T C T C T C G C	140	
P1B 01-E4	A T C G G T C T C G C C T C T C T C G C	140	
P2B 08-H3	A T C G G T C T C G C C T C T C T C G C	140	
P3B 13-D10	A T C G G T C T C G C C T C T C T C G C	140	
P4B 04-H3	A T C G G T C T C G C C T C T C T C G C	140	
P5B 14-C11	A T C G G T C T C G C C T C T C T C G C	140	
P4BSF 03-G10	A T C G G T C T C G C C T C T C T C G C	140	
	140	150	
Wildtyp	T G C C A G C C C T C T G A T C C A G G	159	
P1B 01-H1	T G C C A G C C C T C T G A T C C A G G	160	
P1B 01-E4	T G C C A G C C C T C T G A T C C A G G	160	
P2B 08-H3	T G C C A G C C C T C T G A T C C A G G	160	
P3B 13-D10	T G C C A G C C C T C T G A T C C A G G	160	
P4B 04-H3	T G C C A G C C C T C T G A T C C A G G	160	
P5B 14-C11	T G C C A G C C C T C T G A T C C A G G	160	
P4BSF 03-G10	T G C C A G C C C T C T G A T C C A G G	160	
	160	170	
Wildtyp	C C A G C A C C T A C A C C C A G A C	179	
P1B 01-H1	C C A G C A C C T A C A C C C A G A C	180	
P1B 01-E4	C C A G C A C C T A C A C C C A G A C	180	
P2B 08-H3	C C A G C A C C T A C A C C C A G A C	180	
P3B 13-D10	C C A G C A C C T A C A C C C A G A C	180	
P4B 04-H3	C C A G C A C C T A C A C C C A G A C	180	
P5B 14-C11	C C A G C A C C T A C A C C C A G A C	180	
P4BSF 03-G10	C C A G C A C C T A C A C C C A G A C	180	
	180	190	
Wildtyp	A A A T A C C C C A T C G T G C T G G C	199	
P1B 01-H1	A A A T A C C C C A T C G T G C T G G C	200	
P1B 01-E4	A A A T A C C C C A T C G T G C T G G C	200	
P2B 08-H3	A A A T A C C C C A T C G T G C T G G C	200	
P3B 13-D10	A A A T A C C C C A T C G T G C T G G C	200	
P4B 04-H3	A A A T A C C C C A T C G T G C T G G C	200	
P5B 14-C11	A A A T A C C C C A T C G T G C T G G C	200	
P4BSF 03-G10	A A A T A C C C C A T C G T G C T G G C	200	
	200	210	
Wildtyp	C C A C G G C A T T G C T C G G G C T T C G	219	
P1B 01-H1	C C A C G G C A T T G C T C G G G C T T C G	220	
P1B 01-E4	C C A C G G C A T T G C T C G G G C T T C G	220	
P2B 08-H3	C C A C G G C A T T G C T C G G G C T T C G	220	
P3B 13-D10	C C A C G G C A T T G C T C G G G C T T C G	220	
P4B 04-H3	C C A C G G C A T T G C T C G G G C T T C G	220	
P5B 14-C11	C C A C G G C A T T G C T C G G G C T T C G	220	
P4BSF 03-G10	C C A C G G C A T T G C T C G G G C T T C G	220	
	220	230	
Wildtyp	A C A A C A T C C T C G G G G T C G A C	239	
P1B 01-H1	A C A A C A T C C T C G G G G T C G A C	240	
P1B 01-E4	A C A A C A T C C T C G G G G T C G A C	240	
P2B 08-H3	A C A A C A T C C T C G G G G T C G A C	240	
P3B 13-D10	A C A A C A T C C T C G G G G T C G A C	240	
P4B 04-H3	A C A A C A T C C T C G G G G T C G A C	240	
P5B 14-C11	A C A A C A T C C T C G G G G T C G A C	240	
P4BSF 03-G10	A C A A C A T C C T C G G G G T C G A C	240	

7/13

	240	250	
Wildtyp	T A C T G G T T C G G C A T T T C C C C A G		259
P1B 01-H1	T A C T G G T T C G G C A T T T C C C C A G		260
P1B 01-E4	T A C T G G T T C G G C A T T T C C C C A G		260
P2B 08-H3	T A C T G G T T C G G C A T T T C C C C A G		260
P3B 13-D10	T A C T G G T T C G G C A T T T C C C C A G		260
P4B 04-H3	T A C T G G T T C G G C A T T T C C C C A G		260
P5B 14-C11	T A C T G G T T C G G C A T T T C C C C A G	A	260
P4BSF 03-G10	T A C T G G T T C G G C A T T T C C C C A G		260
	260	270	
Wildtyp	C G C C T T G C G C C G T G A C G G T G		279
P1B 01-H1	C G C C T T G C G C C G T G A C G G T G		280
P1B 01-E4	C G C C T T G C G C C G T G A C G G T G		280
P2B 08-H3	C G C C T T G C G C C G T G A C G G T G		280
P3B 13-D10	C G C C T T G C G C C G T G A C G G T G		280
P4B 04-H3	C G C C T T G C G C C G T G A C G G T G		280
P5B 14-C11	C G C C T T G C G C C G T G A C G G T G		280
P4BSF 03-G10	C G C C T T G C G C C G T G A C G G T G		280
	280	290	
Wildtyp	C C C A G G G T C T A C G T C A C C G A A		299
P1B 01-H1	C C C A G G G T C T A C G T C A C C G A A		300
P1B 01-E4	C C C A G G G T C T A C G T C A C C G A A		300
P2B 08-H3	C C C A G G G T C T A C G T C A C C G A A		300
P3B 13-D10	C C C A G G G T C T A C G T C A C C G A A		300
P4B 04-H3	C C C A G G G T C T A C G T C A C C G A A		300
P5B 14-C11	C C C A G G G T C T A C G T C A C C G A A		300
P4BSF 03-G10	C C C A G G G T C T A C G T C A C C G A A		300
	300	310	
Wildtyp	G T C A G G C C A G T T G G A C A C C T C		319
P1B 01-H1	G T C A G G C C A G T T G G A C A C C T C		320
P1B 01-E4	G T C A G G C C A G T T G G A C A C C T C		320
P2B 08-H3	G T C A G G C C A G T T G G A C A C C T C		320
P3B 13-D10	G G C A G G C C A G T T G G A C A C C T C		320
P4B 04-H3	G G C A G G C C A G T T G G A C A C C T C		320
P5B 14-C11	G G C A G G C C A G T T G G A C A C C T C		320
P4BSF 03-G10	G G C A G G C C A G T T G G A C A C C T C		320
	320	330	
Wildtyp	G G A A G T C C G C G G C G A G C A G T		339
P1B 01-H1	G G A A G T C C G C G G C G A G C A G T		340
P1B 01-E4	G G A A G T C C G C G G C G A G C A G T		340
P2B 08-H3	G G A A G T C C G C G G C G A G C A G T		340
P3B 13-D10	G G A A G T C C G C G G C G A G C A G T		340
P4B 04-H3	G G A A G T C C G C G G C G A G C A G T		340
P5B 14-C11	G G A A G T C C G C G G C G A G C A G T		340
P4BSF 03-G10	G G A A G T C C G C G G C G A G C A G T		340
	340	350	
Wildtyp	T G C T G C A A C A G G T G G A G G G A A		359
P1B 01-H1	T G C T G C A A C A G G T G G A G G G A A		360
P1B 01-E4	T G C T G C A A C A G G T G G A G G G A A		360
P2B 08-H3	T G C T G C A A C A G G T G G A G G G A A		360
P3B 13-D10	T G C T G C A A C A G G T G G A G G G A A		360
P4B 04-H3	T G C T G C A A C A G G T G G A G G G A A		360
P5B 14-C11	T G C T G C A A C A G G T G G A G G G A A		360
P4BSF 03-G10	T G C T G C A A C A G G T G G A G G G A A		360

	360	370	
Wildtyp			
P1B 01-H1	A T C G T C G C C C T C A G G G G C C A	379	
P1B 01-E4	A T C G T C G C C C T C A G G G G C C A	380	
P2B 08-H3	A T C G T C G C C C T C A G G G G C C A	380	
P3B 13-D10	A T C G T C G C C C T C A G G G G C C A	380	
P4B 04-H3	A T C G T C G C C C T C A G G G G C C A	380	
P5B 14-C11	A T C G T C G C C C T C A G G G G C C A	380	
P4BSF 03-G10	A T C G T C G C C C T C A G G G G C C A	380	
	380	390	
Wildtyp			
P1B 01-H1	G C C C A A G G T C A A C C T G A T C G	399	
P1B 01-E4	G C C C A A G G T C A A C C T G A T C G	400	
P2B 08-H3	G C C C A A G G T C A A C C T G A T C G	400	
P3B 13-D10	G C C C A A G G T C A A C C T G A T C G	400	
P4B 04-H3	G C C C A A G G T C A A C C T G A T C G	400	
P5B 14-C11	G C C C A A G G T C A A C C T G A T C G	400	
P4BSF 03-G10	G C C C A A G G T C A A C C T G A T C G	400	
	400	410	
Wildtyp			
P1B 01-H1	G C C A C A G C C A C G G G G G C C G	419	
P1B 01-E4	G C C A C A G C C A C G G G G G C C G	420	
P2B 08-H3	G C C A C A G C C A C G G G G G C C G	420	
P3B 13-D10	G C C A C A G C C A C G G G G G C C G	420	
P4B 04-H3	G C C A C A G C C A C G G G G G C C G	420	
P5B 14-C11	G C C A C A G C C A C G G G G G C C G	420	
P4BSF 03-G10	G C C A C A G C C A C G G G G G C C G	420	
	420	430	
Wildtyp			
P1B 01-H1	A C C A T C C G C T A C G T C G C C G C	439	
P1B 01-E4	A C C A T C C G C T A C G T C G C C G C	440	
P2B 08-H3	A C C A T C C G C T A C G T C G C C G C	440	
P3B 13-D10	A C C A T C C G C T A C G T C G C C G C	440	
P4B 04-H3	A C C A T C C G C T A C G T C G C C G C	440	
P5B 14-C11	A C C A T C C G C T A C G T C G C C G C	440	
P4BSF 03-G10	A C C A T C C G C T A C G T C G C C G C	440	
	440	450	
Wildtyp			
P1B 01-H1	C G T A C G T C C C G A C C T G A T C G	459	
P1B 01-E4	C G T A C G T C C C G A C C T G A T C G	460	
P2B 08-H3	C G T A C G T C C C G A C C T G A T C G	460	
P3B 13-D10	C G T A C G T C C C G A C C T G A T C G	460	
P4B 04-H3	C G T A C G T C C C G A C C T G A T C G	460	
P5B 14-C11	C G T A C G T C C C G A C C T G A T C G	460	
P4BSF 03-G10	C G T A C G T C C C G A C C T G A T C G	460	
	460	470	
Wildtyp			
P1B 01-H1	C T T C C G C C A C C A G G C G T C G G C	479	
P1B 01-E4	C T T C C G C C A C C A G G C G T C G G C	480	
P2B 08-H3	C T T C C G C C A C C A G G C G T C G G C	480	
P3B 13-D10	C T T C C G C C A C C A G G C G T C G G C	480	
P4B 04-H3	C T T C C G C C A C C A G G C G T C G G C	480	
P5B 14-C11	C T T C C G C C A C C A G G C G T C G G C	480	
P4BSF 03-G10	C T T C C G C C A C C A G G C G T C G G C	480	

480												490												
Wildtyp																								499
P1B 01-H1																								500
P1B 01-E4																								500
P2B 08-H3																								500
P3B 13-D10																								500
P4B 04-H3																								500
P5B 14-C11																								500
P4BSF 03-G10																								500
500												510												
Wildtyp																								519
P1B 01-H1																								520
P1B 01-E4																								520
P2B 08-H3																								520
P3B 13-D10																								520
P4B 04-H3																								520
P5B 14-C11																								520
P4BSF 03-G10																								520
520												530												
Wildtyp																								539
P1B 01-H1																								540
P1B 01-E4																								540
P2B 08-H3																								540
P3B 13-D10																								540
P4B 04-H3																								540
P5B 14-C11																								540
P4BSF 03-G10																								540
540												550												
Wildtyp																								559
P1B 01-H1																								560
P1B 01-E4																								560
P2B 08-H3																								560
P3B 13-D10																								560
P4B 04-H3																								560
P5B 14-C11																								560
P4BSF 03-G10																								560
560												570												
Wildtyp																								579
P1B 01-H1																								580
P1B 01-E4																								580
P2B 08-H3																								580
P3B 13-D10																								580
P4B 04-H3																								580
P5B 14-C11																								580
P4BSF 03-G10																								580
580												590												
Wildtyp																								599
P1B 01-H1																								600
P1B 01-E4																								600
P2B 08-H3																								600
P3B 13-D10																								600
P4B 04-H3																								600
P5B 14-C11																								600
P4BSF 03-G10																								600

10/13

Wildtyp	A	G	C	G	G	C	A	I	G	C	A	C	C	G	G	T	A	C	G	C	A	
P1B 01-H1	A	G	C	G	G	C	G	G	C	A	C	C	C	G	G	T	A	C	G	C	A	
P1B 01-E4	A	G	C	G	G	C	G	G	C	A	C	C	C	G	G	T	A	C	G	C	A	
P2B 08-H3	A	G	C	G	G	C	G	G	C	A	C	C	C	G	G	T	A	C	G	C	A	
P3B 13-D10	A	G	C	G	G	C	G	G	C	A	C	C	C	G	G	T	A	C	G	C	A	
P4B 04-H3	A	G	C	G	G	C	G	G	C	A	C	C	C	G	G	T	A	C	G	C	A	
P5B 14-C11	A	G	C	G	G	C	G	G	C	A	C	C	C	G	G	T	A	C	G	C	A	
P4BSF 03-G10	A	G	C	G	G	C	G	A	T	C	G	G	T	A	C	G	C	A	G	C	A	
	600																				619	
	610																					
Wildtyp	G	A	A	T	T	T	C	A	C	T	G	G	G	C	T	C	G	C	T	G	G	
P1B 01-H1	G	A	A	T	T	T	C	A	C	T	G	G	G	C	T	C	G	C	T	G	G	
P1B 01-E4	G	A	A	T	T	T	C	A	C	T	G	G	G	C	T	C	G	C	T	G	G	
P2B 08-H3	G	A	A	T	T	T	T	A	C	T	G	G	G	C	T	C	G	C	T	G	G	
P3B 13-D10	G	A	A	T	T	T	T	A	C	T	G	G	G	C	T	C	G	C	T	G	G	
P4B 04-H3	G	A	A	T	T	T	T	A	C	T	G	G	G	C	T	C	G	C	T	G	G	
P5B 14-C11	G	A	A	T	T	T	T	A	C	T	G	G	G	C	T	C	G	C	T	G	G	
P4BSF 03-G10	G	A	A	T	T	T	T	T	C	T	G	G	G	C	T	C	G	C	T	G	G	
	620																					639
	630																					
Wildtyp	A	G	T	C	G	C	T	G	A	A	C	A	G	C	G	A	G	G	G	T	659	
P1B 01-H1	A	G	T	C	G	C	T	G	A	A	C	A	G	C	G	A	G	G	G	T	660	
P1B 01-E4	A	G	T	C	G	C	T	G	A	A	C	A	G	C	G	A	G	G	G	T	660	
P2B 08-H3	A	G	T	C	G	C	T	G	A	A	C	A	G	C	G	A	G	G	G	T	660	
P3B 13-D10	A	G	T	C	G	C	T	G	A	A	C	A	G	C	G	A	G	G	G	T	660	
P4B 04-H3	A	G	T	C	G	C	T	G	A	A	C	A	G	C	G	A	G	G	G	T	660	
P5B 14-C11	A	G	T	C	G	C	T	G	A	A	C	A	G	C	G	A	G	G	G	T	660	
P4BSF 03-G10	A	G	T	C	G	C	T	G	A	A	C	A	G	C	G	A	G	G	G	T	660	
	640																					650
	650																					
Wildtyp	G	C	C	G	G	C	G	C	T	T	T	C	A	A	C	G	C	C	A	A	679	
P1B 01-H1	G	C	C	G	G	C	G	C	T	T	T	C	A	A	C	G	C	C	A	A	680	
P1B 01-E4	G	C	C	G	G	C	G	C	T	T	T	C	A	A	C	G	C	C	A	A	680	
P2B 08-H3	G	C	C	G	G	C	G	C	T	T	T	C	A	A	C	G	C	C	A	A	680	
P3B 13-D10	G	C	C	G	G	C	G	C	T	T	T	C	A	A	C	G	C	C	A	A	680	
P4B 04-H3	G	C	C	G	G	C	G	C	T	T	T	C	A	A	C	G	C	C	A	A	680	
P5B 14-C11	G	C	C	G	G	C	G	C	T	T	T	C	A	A	C	G	C	C	A	A	680	
P4BSF 03-G10	G	C	C	G	G	C	G	C	T	T	T	C	A	A	C	G	C	C	A	A	680	
	660																					670
	670																					
Wildtyp	G	C	C	G	G	C	G	C	T	T	T	C	A	A	C	G	C	C	A	A	679	
P1B 01-H1	G	C	C	G	G	C	G	C	T	T	T	C	A	A	C	G	C	C	A	A	680	
P1B 01-E4	G	C	C	G	G	C	G	C	T	T	T	C	A	A	C	G	C	C	A	A	680	
P2B 08-H3	G	C	C	G	G	C	G	C	T	T	T	C	A	A	C	G	C	C	A	A	680	
P3B 13-D10	G	C	C	G	G	C	G	C	T	T	T	C	A	A	C	G	C	C	A	A	680	
P4B 04-H3	G	C	C	G	G	C	G	C	T	T	T	C	A	A	C	G	C	C	A	A	680	
P5B 14-C11	G	C	C	G	G	C	G	C	T	T	T	C	A	A	C	G	C	C	A	A	680	
P4BSF 03-G10	G	C	C	G	G	C	G	C	T	T	T	C	A	A	C	G	C	C	A	A	680	
	680																					690
	690																					
Wildtyp	G	T	A	C	C	C	G	C	A	G	G	G	C	A	T	C	C	C	C	A	699	
P1B 01-H1	G	T	A	C	C	C	G	C	A	G	G	G	C	A	T	C	C	C	C	A	700	
P1B 01-E4	G	T	A	C	C	C	G	C	A	G	G	G	C	A	T	C	C	C	C	A	700	
P2B 08-H3	G	T	A	C	C	C	G	C	A	G	G	G	C	A	T	C	C	C	C	A	700	
P3B 13-D10	G	T	A	C	C	C	G	C	A	G	G	G	C	A	T	C	C	C	C	A	700	
P4B 04-H3	G	T	A	C	C	C	G	C	A	G	G	G	C	A	T	C	C	C	C	A	700	
P5B 14-C11	G	T	A	C	C	C	G	C	A	G	G	G	C	A	T	C	C	C	C	A	700	
P4BSF 03-G10	G	T	A	C	C	C	G	C	A	G	G	G	C	A	T	C	C	C	C	A	700	
	700																					710
	710																					
Wildtyp	C	C	T	C	G	G	C	C	T	G	C	G	G	C	G	A	A	G	G	C	719	
P1B 01-H1	C	C	T	C	G	G	C	C	T	G	C	G	G	C	G	A	A	G	G	C	720	
P1B 01-E4	C	C	T	C	G	G	C	C	T	G	C	G	G	C	G	A	A	G	G	C	720	
P2B 08-H3	C	C	T	C	G	G	C	C	T	G	C	G	G	C	G	A	A	G	G	C	720	
P3B 13-D10	C	C	T	C	G	G	C	C	T	G	C	G	G	C	G	A	A	G	G	C	720	
P4B 04-H3	C	C	T	C	G	G	C	C	T	G	C	G	G	C	G	A	A	G	G	C	720	
P5B 14-C11	C	C	T	C	G	G	C	C	T	G	C	G	G	C	G	A	A	G	G	C	720	
P4BSF 03-G10	C	C	T	C	G	G	C	C	T	G	C	G	G	C	G	A	A	G	G	C	720	

	720	730	
Wildtyp	G C C T A C A A G G T C A A C G G G C G T	739	
P1B 01-H1	G C C T A C A A G G T C A A C G G G C G T	740	
P1B 01-E4	G C C T A C A A G G T C A A C G G G C G T	740	
P2B 08-H3	G C C T A C A A G G T C A A C G G G C G T	740	
P3B 13-D10	G C C T A C A A G G T C A A C G G G C G T	740	
P4B 04-H3	G C T A C A A G G T C A A C G G G C G T	740	
P5B 14-C11	G C T A C A A G G T C A A C G G G C G T	740	
P4BSF 03-G10	G C C T A C A A G G T C A A C G G G C G T	740	
	740	750	
Wildtyp	G A G C T A T T A C T C C T G G A G C G	759	
P1B 01-H1	G A G C T A T T A C T C C T G G A G C G	760	
P1B 01-E4	G A G C T A T T A C T C C T G G A G C G	760	
P2B 08-H3	G A G C T A T T A C T C C T G G A G C G	760	
P3B 13-D10	G A G C T A T T A C T C C T G G A G C G	760	
P4B 04-H3	G A G C T A T T A C T C C T G G A G C G	760	
P5B 14-C11	G A G C T A T T A C T C C T G G A G C G	760	
P4BSF 03-G10	G A G C T A T T A C T C C T G G A G C G	760	
	760	770	
Wildtyp	G T T C C T C G C C G C T G A C C A A C	779	
P1B 01-H1	G T T C C T C G C C G C T G A C C A A C	780	
P1B 01-E4	G T T C C T C G C C G C T G A C C A A C	780	
P2B 08-H3	G T T C C T C G C C G C T G A C C A A C	780	
P3B 13-D10	G T T C C T C G C C G C T G A C C A A C	780	
P4B 04-H3	G T T C C T C G C C G C T G A C C A A C	780	
P5B 14-C11	G T T C C T C G C C G C T G A C C A A C	780	
P4BSF 03-G10	G T T C C T C G C C G C T G A C C A A C	780	
	780	790	
Wildtyp	T T C C T C G A T T C C G A G C G A C G C	799	
P1B 01-H1	T T C C T C G A T T C C G A G C G A C G C	800	
P1B 01-E4	T T C C T C G A T T C C G A G C G A C G C	800	
P2B 08-H3	T T C C T C G A T T C C G A G C G A C G C	800	
P3B 13-D10	T T C C T C G A T T C C G A G C G A C G C	800	
P4B 04-H3	T T C C T C G A T T C C G A G C G A C G C	800	
P5B 14-C11	T T C C T C G A T T C C G A G C G A C G C	800	
P4BSF 03-G10	T T C C T C G A T T C C G A G C G A C G C	800	
	800	810	
Wildtyp	C T T C C T C G G C G C T C G T C G C	819	
P1B 01-H1	C T T C C T C G G C G C T C G T C G C	820	
P1B 01-E4	C T T C C T C G G C G C T C G T C G C	820	
P2B 08-H3	C T T C C T C G G C G C T C G T C G C	820	
P3B 13-D10	C T T C C T C G G C G C T C G T C G C	820	
P4B 04-H3	C T T C C T C G G C G C T C G T C G C	820	
P5B 14-C11	C T T C C T C G G C G C T C G T C G C	820	
P4BSF 03-G10	C T T C C T C G G C G C T C G T C G C	820	
	820	830	
Wildtyp	T G A C C T T C A A A G A A C G G C A C C	839	
P1B 01-H1	T G A C C T T C A A A G A A C G G C A C C	840	
P1B 01-E4	T G A C C T T C A A A G A A C G G C A C C	840	
P2B 08-H3	T G A C C T T C A A A G A A C G G C A C C	840	
P3B 13-D10	T G A C C T T C A A A G A A C G G C A C C	840	
P4B 04-H3	T G A C C T T C A A A G A A C G G C A C C	840	
P5B 14-C11	T G A C C T T C A A A G A A C G G C A C C	840	
P4BSF 03-G10	T G A C C T T C A A A G A A C G G C A C C	840	

840												850												859		
Wildtyp												G	C	C	A	A	C	G	A	C	G	G	C			
P1B 01-H1												G	C	C	A	A	C	G	A	C	G	G	C			
P1B 01-E4												G	C	C	A	A	C	G	A	C	G	G	C			
P2B 08-H3												G	C	C	A	A	C	G	A	C	G	G	C			
P3B 13-D10												G	C	C	A	A	C	G	A	C	G	G	C			
P4B 04-H3												G	C	C	A	A	C	G	A	C	G	G	C			
P5B 14-C11												G	C	C	A	A	C	G	A	C	G	G	C			
P4BSF 03-G10												G	C	C	A	A	C	G	A	C	G	G	C			
860												870														
Wildtyp												C	A	C	C	T	G	C	A	C	C	T	G	G	879	
P1B 01-H1												C	A	C	C	T	G	C	A	C	C	T	G	G	880	
P1B 01-E4												C	A	C	C	T	G	C	A	C	C	T	G	G	880	
P2B 08-H3												C	A	C	C	T	G	C	A	C	C	T	G	G	880	
P3B 13-D10												C	A	C	C	T	G	C	A	C	C	T	G	G	880	
P4B 04-H3												C	A	C	C	T	G	C	A	C	C	T	G	G	880	
P5B 14-C11												C	A	C	C	T	G	C	A	C	C	T	G	G	880	
P4BSF 03-G10												C	A	C	C	T	G	C	A	C	C	T	G	G	880	
880												890														
Wildtyp												G	C	A	T	G	G	T	G	A	C	A	A	C	899	
P1B 01-H1												G	C	A	T	G	G	T	G	A	C	A	A	C	900	
P1B 01-E4												G	C	A	T	G	G	T	G	C	G	A	C	A	900	
P2B 08-H3												G	C	A	T	G	G	T	G	C	G	A	C	A	900	
P3B 13-D10												G	C	A	T	G	G	T	G	C	G	A	C	A	900	
P4B 04-H3												G	C	A	T	G	G	T	G	C	G	A	C	A	900	
P5B 14-C11												G	C	A	T	G	G	T	G	C	G	A	C	A	900	
P4BSF 03-G10												G	C	A	T	G	G	T	G	C	G	A	C	A	900	
900												910														919
Wildtyp												T	A	C	C	G	G	A	T	G	A	C	C	T	G	G
P1B 01-H1												T	A	C	C	G	G	A	T	G	A	C	C	T	G	G
P1B 01-E4												T	A	C	C	G	G	A	T	G	A	C	C	T	G	G
P2B 08-H3												T	A	C	C	G	G	A	T	G	A	C	C	T	G	G
P3B 13-D10												T	A	C	C	G	G	A	T	G	A	C	C	T	G	G
P4B 04-H3												T	A	C	C	G	G	A	T	G	A	C	C	T	G	G
P5B 14-C11												T	A	C	C	G	G	A	T	G	A	C	C	T	G	G
P4BSF 03-G10												T	A	C	C	G	G	A	T	G	A	C	C	T	G	G
920												930														939
Wildtyp												C	G	A	G	G	T	G	A	C	C	T	T	T	C	G
P1B 01-H1												C	G	A	G	G	T	G	A	C	C	T	T	T	C	G
P1B 01-E4												C	G	A	G	G	T	G	A	C	C	T	T	T	C	G
P2B 08-H3												C	G	A	G	G	T	G	A	C	C	T	T	T	C	G
P3B 13-D10												C	G	A	G	G	T	G	A	C	C	T	T	T	C	G
P4B 04-H3												C	G	A	G	G	T	G	A	C	C	T	T	T	C	G
P5B 14-C11												C	G	A	G	G	T	G	A	C	C	T	T	T	C	G
P4BSF 03-G10												C	G	A	G	G	T	G	A	C	C	T	T	T	C	G
940												950														959
Wildtyp												G	C	C	T	C	A	C	C	G	C	C	T	G	A	959
P1B 01-H1												G	C	C	T	C	A	C	C	G	C	C	T	G	A	960
P1B 01-E4												G	C	C	T	C	A	C	C	G	C	C	T	G	A	960
P2B 08-H3												G	C	C	T	C	A	C	C	G	C	C	T	G	A	960
P3B 13-D10												G	C	C	T	C	A	C	C	G	C	C	T	G	A	960
P4B 04-H3												G	C	C	T	C	A	C	C	G	C	C	T	G	A	960
P5B 14-C11												G	C	C	T	C	A	C	C	G	C	C	T	G	A	960
P4BSF 03-G10												G	C	C	T	C	A	C	C	G	C	C	T	G	A	960

	960	970	
Wildtyp			
P1B 01-H1	A C C C A G C C C G G T C A G C G T C T A		979
P1B 01-E4	A C C C A G C C C G G T C A G C G T C T A		980
P2B 08-H3	A C C C A G C C C G G T C A G C G T C T A		980
P3B 13-D10	A C C C A G C C C G G T C A G C G T C T A		980
P4B 04-H3	A C C C A G C C C G G T C A G C G T C T A		980
P5B 14-C11	A C C C A G C C C G G T C A G C G T C T A		980
P4BSF 03-G10	A C C C A G C C C G G T C A G C G T C T A		980
	980	990	
Wildtyp			
P1B 01-H1	C C G C C C A G C A C G C C C A A C C G C C		999
P1B 01-E4	C C G C C C A G C A C G C C C A A C C G C C		1000
P2B 08-H3	C C G C C C A G C A C G C C C A A C C G C C		1000
P3B 13-D10	C C G C C C A G C A C G C C C A A C C G C C		1000
P4B 04-H3	C C G C C C A G C A C G C C C A A C C G C C		1000
P5B 14-C11	C C G C C C A G C A C G C C C A A C C G C C		1000
P4BSF 03-G10	C C G C C C A G C A C G C C C A A C C G C C		1000
	1000	1010	
Wildtyp			
P1B 01-H1	T G A A G A A C G C C A G C C T G T A G		1019
P1B 01-E4	T G A A G A A C G C C A G C C T G T A G		1020
P2B 08-H3	T G A A G A A C G C C A G C C T G T A G		1020
P3B 13-D10	T G A A G A A C G C C A G C C T G T A G		1020
P4B 04-H3	T G A A G A A C G C C A G C C T G T A G		1020
P5B 14-C11	T G A A G A A C G C C A G C C T G T A G		1020
P4BSF 03-G10	T G A A G A A C G C C A G C C T G T A G		1020
	1020	1030	
Wildtyp			
P1B 01-H1	G A C C C C G G C C G G G G C C T C G G		1039
P1B 01-E4	G A C C C C G G C C G G G G C C T C G G		1040
P2B 08-H3	G A C C C C G G C C G G G G C C T C G G		1040
P3B 13-D10	G A C C C C G G C C G G G G C C T C G G		1040
P4B 04-H3	G A C C C C G G C C G G G G C C T C G G		1040
P5B 14-C11	G A C C C C G G C C G G G G C C T C G G		1040
P4BSF 03-G10	G A C C C C G G C C G G G G C C T C G G		1040
	1040		
Wildtyp			
P1B 01-H1	C C C G G G G C C		1047
P1B 01-E4	C C C G G G G C C		1049
P2B 08-H3	C C C G G G G C C		1049
P3B 13-D10	C C C G G G G C C		1049
P4B 04-H3	C C C G G G G C C [G]		1050
P5B 14-C11	C C C G G G G C C		1049
P4BSF 03-G10	C C C G G G G C C		1049

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Studiengesellschaft Kohle mbH
- (B) STRASSE: Kaiser-Wilhelm-Platz 1
- (C) ORT: Muelheim an der Ruhr
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 45470

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur Herstellung und Identifizierung neuer Hydrolasen mit verbesserten Eigenschaften

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 21

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetische DNA"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GCGCAATTAA CCCTCACTAA AGGAAACAAA

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetische DNA"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GCGTAATACG ACTCACTATA GGGCGAA

27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1049 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 85..1017

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
- (B) LAGE: 163..1017

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GGATCCCCCG GTTCTCCCGG AAGGATTCGG GCGATGGCTG GCAGGACGCG CCCCTCGGCC	60
CCATCAACCT GAGATGAGAA CAAC ATG AAG AAG AAG TAT CTG CTC CCC CTC	111
Met Lys Lys Lys Tyr Leu Leu Pro Leu	
-26 -25 -20	
GGC CTG GCC ATC GGT CTC GCC TCT CTC GCT GCC AGC CCT CTG ATC CAG	159
Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln	
-15 -10 -5	
GCC AGC ACC TAC ACC CAG ACC AAA TAC CCC ATC GTG CTG GCC CAC GGC	207
Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly	
1 5 10 15	
ATG CTC GGC TTC GAC AAC ATC CTC GGG GTC GAC TAC TGG TTC GGC ATT	255
Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile	
20 25 30	
CCC AGC GCC TTG CGC CGT GAC GGT GCC CAG GTC TAC GTC ACC GAA GTC	303
Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp Gly Ala Gln Val Tyr Val Glu Val	
35 40 45	
AGC CAG TTG GAC ACC TCG GAA GTC CGC GGC GAG CAG TTG CTG CAA CAG	351
Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln	
50 55 60	
GTC GAG GAA ATC GTC GCC CTC AGC GGC CAG CCC AAG GTC AAC CTG ATC	399
Val Glu Ile Val Ala Leu Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile	
65 70 75	
GGC CAC AGC CAC GGC GGG CCG ACC ATC CGC TAC GTC GCC GGC GTA CGT	447
Gly His Ser His Gly Gly Pro Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg	
80 85 90 95	
CCC GAC CTG ATC GCT TCC GCC ATC AGC GTC GGC GGC CCG CAC AAG GGT	495
Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala Ile Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly	
100 105 110	
TCG GAC ACC GCC GAC TTC CTG CGC CAG ATC CCA CCG GGT TCG GCC GGC	543
Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly	
115 120 125	

GAG GCA GTC CTC TCC GGG CTG GTC AAC AGC CTC GGC GCG CTG ATC AGC Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser 130 135 140	591
TTC CTT TCC AGC GGC GGC ACC GGT ACG CAG AAT TCA CTG GGC TCG CTG Phe Leu Ser Ser Gly Gly Thr Gly Thr Gln Asn Ser Leu Gly Ser Leu 145 150 155	639
GAG TCG CTG AAC AGC GAG GGT GCC GCG CGC TTC AAC GCC AAG TAC CCG Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro 160 165 170 175	687
CAG GGC ATC CCC ACC TCG GCC TGC GGC GAA GGC GCC TAC AAG GTC AAC Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn 180 185 190	735
GGC GTG AGC TAT TAC TCC TGG AGC GGT TCC TCG CCG CTG ACC AAC TTC Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe 195 200 205	783
CTC GAT CCG AGC GAC GCC TTC CTC GGC GCC TCG TCG CTG ACC TTC AAG Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys 210 215 220	831
AAC GGC ACC GCC AAC GAC GGC CTG GTC GGC ACC TGC AGT TCG CAC CTG Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu 225 230 235	879
GGC ATG GTG ATC CGC GAC AAC TAC CGG ATG AAC CAC CTG GAC GAG GTG Gly Met Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val 240 245 250 255	927
AAC CAG GTC TTC GGC CTC ACC AGC CTG TTC GAG ACC AGC CCG GTC AGC Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser 260 265 270	975
GTC TAC CGC CAG CAC GCC AAC CGC CTG AAG AAC GCC AGC AGC CTG Val Tyr Arg Gln His Ala Asn Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu 275 280 285	1017
TAGGACCCCG GCCGGGGCCT CGGCCCGGGC CC	1049

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 311 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Lys Lys Lys Tyr Leu Leu Pro Leu Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala -26 -25 -20 -15
Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr -10 -5 1 5

Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile
 10 15 20
 Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp
 25 30 35
 Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Val Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu
 40 45 50
 Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Val Glu Glu Ile Val Ala Leu
 55 60 65 70
 Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile Gly His Ser His Gly Gly Pro
 75 80 85
 Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala
 90 95 100
 Ile Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu
 105 110 115
 Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu
 120 125 130
 Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser Phe Leu Ser Ser Gly Gly Thr
 135 140 145 150
 Gly Thr Gln Asn Ser Leu Gly Ser Leu Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly
 155 160 165
 Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala
 170 175 180
 Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp
 185 190 195
 Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe
 200 205 210
 Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly
 215 220 225 230
 Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu Gly Met Val Ile Arg Asp Asn
 235 240 245
 Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr
 250 255 260
 Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser Val Tyr Arg Gln His Ala Asn
 265 270 275
 Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu
 280 285

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 1049 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: nicht bekannt

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE: 85..1017

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
(B) LAGE:163..1017

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GGATCCCCCG GTTCTCCCGG AAGGATTCGG GCGATGGCTG GCAGGACGCG CCCCTCGGCC	60
CCATCAACCT GAGATGAGAA CAAC ATG AAG AAG AAG TCT CTG CTC CCC CTC Met Lys Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu -26 -25 -20	111
GGC CTG GCC ATC GGT CTC GCC TCT CTC GCT GCC AGC CCT CTG ATC CAG Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln -15 -10 -5	159
GCC AGC ACC TAC ACC CAG ACC AAA TAC CCC ATC GTG CTG GCC CAC GGC Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly 1 5 10 15	207
ATG CTC GGC TTC GAC AAC ATC CTC GGG GTC GAC TAC TGG TTC GGC ATT Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile 20 25 30	255
CCC AGC GCC TTG CGC CGT GAC GGT GCC CAG GTC TAC GTC ACC GAA GTC Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Val 35 40 45	303
AGC CAG TTG GAC ACC TCG GAA GTC CGC GGC GAG CAG TTG CTG CAA CAG Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln 50 55 60	351
GTG GAG GAA ATC GTC GCC CTC AGC GGC CAG CCC AAG GTC AAC CTG ATC Val Glu Glu Ile Val Ala Leu Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile 65 70 75	399
GGC CAC AGC CAC GGC GGG CCG ACC ATC CGC TAC GTC GCC GCC GTA CGT Gly His Ser His Gly Gly Pro Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg 80 85 90 95	447
CCC GAC CTG ATC GCT TCC GCC ACC AGC GTC GGC GCC CCG CAC AAG GGT Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala Thr Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly 100 105 110	495
TCG GAC ACC GCC GAC TTC CTG CGC CAG ATC CCA CCG GGT TCG GCC GGC Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly 115 120 125	543
GAG GCA GTC CTC TCC GGG CTG GTC AAC AGC CTC GGC GCG CTG ATC AGC Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser 130 135 140	591

TTC CTT TCC AGC GGC GGC ACC GGT ACG CAG AAT TCA CTG GGC TCG CTG Phe Leu Ser Ser Gly Gly Thr Gly Thr Gln Asn Ser Leu Gly Ser Leu 145 150 155	639	
GAG TCG CTG AAC AGC GAG GGT GCC GCG CGC TTC AAC GCC AAG TAC CCG Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro 160 165 170 175	687	
CAG GGC ATC CCC ACC TCG GCC TGC GGC GAA GGC GCC TAC AAG GTC AAC Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn 180 185 190	735	
GGC GTG AGC TAT TAC TCC TGG AGC GGT TCC TCG CCG CTG ACC AAC TTC Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe 195 200 205	783	
CTC GAT CCG AGC GAC GCC TTC CTC GGC GCC TCG TCG CTG ACC TTC AAG Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys 210 215 220	831	
AAC GGC ACC GCC AAC GAC GGC CTG GTC GGC ACC TGC AGT TCG CAC CTG Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu 225 230 235	879	
GGC ATG GTG ATC CGC GAC AAC TAC CGG ATG AAC CAC CTG GAC GAG GTG Gly Met Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val 240 245 250 255	927	
AAC CAG GTC TTC GGC CTC ACC AGC CTG TTC GAG ACC AGC CCG GTC AGC Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser 260 265 270	975	
GTC TAC CGC CAG CAC GCC AAC CGC CTG AAG AAC GCC AGC CTG Val Tyr Arg Gln His Ala Asn Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu 275 280 285	1017	
TAGGACCCCG GCCGGGGCCT CGGCCGGGC CC		1049

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 311 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Met Lys Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala -26 -25 -20 -15	
Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr -10 -5 1 5	
Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile 10 15 20	

Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp
 25 30 35

Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Val Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu
 40 45 50

Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln Val Glu Glu Ile Val Ala Leu
 55 60 65 70

Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile Gly His Ser His Gly Gly Pro
 75 80 85

Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala
 90 95 100

Thr Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu
 105 110 115

Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu
 120 125 130

Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser Phe Leu Ser Ser Gly Gly Thr
 135 140 145 150

Gly Thr Gln Asn Ser Leu Gly Ser Leu Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly
 155 160 165

Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala
 170 175 180

Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp
 185 190 195

Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe
 200 205 210

Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly
 215 220 225 230

Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu Gly Met Val Ile Arg Asp Asn
 235 240 245

Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr
 250 255 260

Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser Val Tyr Arg Gln His Ala Asn
 265 270 275

Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu
 280 285

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 1049 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: nicht bekannt
 - (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE: 85.1017

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
(B) LAGE:163..1017

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

TTC CTT TCC AGC GGC ACC GGT ACG CAG AAT TTA CTG GGC TCG CTG Phe Leu Ser Ser Gly Gly Thr Gly Thr Gln Asn Leu Leu Gly Ser Leu 145 150 155	639
GAG TCG CTG AAC AGC GAG GGT GCC GCG CGC TTC AAC GCC AAG TAC CCG Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro 160 165 170 175	687
CAG GGC ATC CCC ACC TCG GCC TGC GGC GAA GGC GCC TAC AAG GTC AAC Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn 180 185 190	735
GGC GTG AGC TAT TAC TCC TGG AGC GGT TCC TCG CCG CTG ACC AAC TTC Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe 195 200 205	783
CTC GAT CCG AGC GAC GCC TTC CTC GGC GCC TCG TCG CTG ACC TTC AAG Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys 210 215 220	831
AAC GGC ACC GCC AAC GAC GGC CTG GTC GGC ACC TGC AGT TCG CAC CTG Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu 225 230 235	879
GGC ATG GTG ATC CGC GAC AAC TAC CGG ATG AAC CAC CTG GAC GAG GTG Gly Met Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val 240 245 250 255	927
AAC CAG GTC TTC GGC CTC ACC AGC CTG TTC GAG ACC AGC CCG GTC AGC Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser 260 265 270	975
GTC TAC CGC CAG CAC GCC AAC CGC CTG AAG AAC GCC AGC CTG Val Tyr Arg Gln His Ala Asn Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu 275 280 285	1017
TAGGACCCCG GCCGGGGCCT CGGGCCGGGC CC 1049	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 311 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Met Lys Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala -26 -25 -20 -15	
Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr -10 -5 1 5	
Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile 10 15 20	
Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp	

10

25	30	35
Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Val Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu		
40	45	50
Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Val Glu Glu Ile Val Ala Leu		
55	60	65
Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile Gly His Ser His Gly Gly Pro		
75	80	85
Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala		
90	95	100
Thr Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu		
105	110	115
Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu		
120	125	130
Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser Phe Leu Ser Ser Gly Gly Thr		
135	140	145
Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp		
185	190	195
Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe		
200	205	210
Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly		
215	220	225
Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu Gly Met Val Ile Arg Asp Asn		
235	240	245
Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr		
250	255	260
Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser Val Tyr Arg Gln His Ala Asn		
265	270	275
Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu		
280	285	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 1047 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: nicht bekannt
 - (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE: 84..1016

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
 (B) LAGE: 162..1016

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

GGATCCCCGG TTCTCCCGGA AGGATTGGGG CGATGGCTGG CAGGACGCGC CCCTCGGCCC	60
CATCAACCTG AGATGAGAAC AAC ATG AAG AAG TCT CTG CTC CCC CTC	110
Met Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu	
-26 -25 -20	
GGC CTG GCC ATC GGT CTC GCC TCT CTC GCT GCC AGC CCT CTG ATC CAG	158
Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln	
-15 -10 -5	
GCC AGC ACC TAC ACC CAG ACC AAA TAC CCC ATC GTG CTG GCC CAC GGC	206
Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly	
1 5 10 15	
ATG CTC GGC TTC GAC AAC ATC CTC GGG GTC GAC TAC TGG TTC GGC ATT	254
Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile	
20 25 30	
CCC AGC GCC TTG CGC CGT GAC GGT GCC CAG GTC TAC GTC ACC GAA GTC	302
Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Val	
35 40 45	
AGC CAG TTG GAC ACC TCG GAA GTC CGC GGC GAG CAG TTG CTG CAA CAG	350
Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln	
50 55 60	
GTG GAG GAA ATC GTC GCC CTC AGC GGC CAG CCC AAG GTC AAC CTG ATC	398
Val Glu Glu Ile Val Ala Leu Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile	
65 70 75	
GGC CAC AGC CAC GGC GGG CCG ACC ATC CGC TAC GTC GCC GCC GTA CGT	446
Gly His Ser His Gly Gly Pro Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg	
80 85 90 95	
CCC GAC CTG ATC GCT TCC GCC ACC AGC GTC GGC GCC CCG CAC AAG GGT	494
Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala Thr Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly	
100 105 110	
TCG GAC ACC GCC GAC TTC CTG CGC CAG ATC CCA CCG GGT TCG GCC GGC	542
Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly	
115 120 125	
GAG GCA GTC CTC TCC GGG CTG GTC AAC AGC CTC GGC GCG CTG ATC AGC	590
Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser	
130 135 140	
TTC CTT TCC AGC GGC AGC ACC GGT ACG CAG AAT TCA CTG GGC TCG CTG	638
Phe Leu Ser Ser Gly Ser Thr Gly Thr Gln Asn Ser Leu Gly Ser Leu	
145 150 155	

GAG TCG CTG AAC AGC GAG GGT GCC GCG CGC TTC AAC GCC AAG TAC CCG	686
Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro	
160 165 170 175	
CAG GGC ATC CCC ACC TCG GCC TGC GGC GAA GGC GCC TAC AAG GTC AAC	734
Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn	
180 185 190	
GGC GTG AGC TAT TAC TCC TGG AGC GGT TCC TCG CCG CTG ACC AAC TTC	782
Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe	
195 200 205	
CTC GAT CCG AGC GAC GCC TTC CTC GGC GCC TCG TCG CTG ACC AAC TTC	830
Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys	
210 215 220	
AAC GGC ACC GCC AAC GAC GGC CTG GTC GGC ACC TGC AGT TCG CAC CTG	878
Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu	
225 230 235	
GGC ATG GTG ATC CGC GAC AAC TAC CGG ATG AAC CAC CTG GAC GAG GTG	926
Gly Met Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val	
240 245 250 255	
AAC CAG GTC TTC GGC CTC ACC AGC CTG TTC GAG ACC AGC CCG GTC AGC	974
Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser	
260 265 270	
GTC TAC CGC CAG CAC GCC AAC CGC CTG AAG AAC GCC AGC CTG	1016
Val Tyr Arg Gln His Ala Asn Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu	
275 280 285	
TAGGACCCCG GCCGGGGCCT CGGCCCGGGC C	
1047	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 311 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Met Lys Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala	
-26 -25 -20 -15	
Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr	
-10 -5 1 5	
Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile	
10 15 20	
Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp	
25 30 35	

Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Val Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu
 40 45 50
 val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln Val Glu Glu Ile Val Ala Leu
 55 60 65 70
 Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile Gly His Ser His Gly Gly Pro
 75 80 85
 Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala
 90 95 100
 Thr Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu
 105 110 115
 Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu
 120 125 130
 Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser Phe Leu Ser Ser Gly Ser Thr
 135 140 145 150
 Gly Thr Gln Asn Ser Leu Gly Ser Leu Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly
 155 160 165
 Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala
 170 175 180
 Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp
 185 190 195
 Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe
 200 205 210
 Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly
 215 220 225 230
 Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu Gly Met Val Ile Arg Asp Asn
 235 240 245
 Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr
 250 255 260
 Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser Val Tyr Arg Gln His Ala Asn
 265 270 275
 Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu
 280 285

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 1050 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: nicht bekannt
 - (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 85..1017

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
(B) LAGE: 163..1017

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

GGATCCCCCG GTTCTCCCGG AAGGATTCGG GCGATGGCTG GCAGGACGCG CCCCTCGGCC	60
CCATCAACCT GAGATGAGAA CAAC ATG AAG AAG AAG TCT CTG CTC CCC CTC	111
Met Lys Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu	
-26 -25 -20	
GGC CTG GCC ATC GGT CTC GCC TCT CTC GCT GCC AGC CCT CTG ATC CAG	159
Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln	
-15 -10 -5	
GCC AGC ACC TAC ACC CAG ACC AAA TAC CCC ATC GTG CTG GCC CAC GGC	207
Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly	
1 5 10 15	
ATG CTC GGC TTC GAC AAC ATC CTT GGG GTC GAC TAC TGG TTC GGC ATT	255
Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile	
20 25 30	
CCC AAC GCC TTG CGC CGT GAC GGT GCC CAG GTC TAC GTC ACC GAA GGC	303
Pro Asn Ala Leu Arg Arg Asp Gly Ala Gln Val Tyr Val Glu Gly	
35 40 45	
AGC CAG TTG GAC ACC TCG GAA GTC CGC GGC GAG CAG TTG CTG CAA CAG	351
Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln	
50 55 60	
GTC GAG GAA ATC GTC GCC CTC AGC GGC CAG CCC AAG GTC AAC CTG ATC	399
Val Glu Ile Val Ala Leu Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile	
65 70 75	
GGC CAC AGC CAC GGC GGG CCG ACC ATC CGC TAC GTC GCC GGC GTA CGT	447
Gly His Ser His Gly Gly Pro Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg	
80 85 90 95	
CCC GAC CTG ATC GCT TCC GCC ACC AGC GTC GGC GCC CCG CAC AAG GGT	495
Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala Thr Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly	
100 105 110	
TCG GAC ACC GCC GAC TTC CTG CGC CAG ATC CCA CCG GGT TCG GCC GGC	543
Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly	
115 120 125	
GAG GCA GTC CTC TCC GGG CTG GTC AAC AGC CTC GGC GCG CTG ATC AGC	591
Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser	
130 135 140	
TTC CTT TCC AGC GGC GGC ACC GGT ACG CAG AAT TTA CTG GGC TCG CTG	639
Phe Leu Ser Ser Gly Gly Thr Gly Thr Gln Asn Leu Leu Gly Ser Leu	
145 150 155	

GAG TCG CTG AAC AGC GAG GGT GCC GCG CGC TTC AAC GCC AAG TAC CCG	687	
Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro		
160 165 170 175		
CAG GGC ATC CCC ACC TCG GCC TGC GGC GAA GGC GCT TAC AAG GTC AAC	735	
Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn		
180 185 190		
GGC GTG AGC TAT TAC TCC TGG AGC GGT TCC TCG CCG CTG ACC AAC TTC	783	
Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe		
195 200 205		
CTC GAT CCG AGC GAC GCC TTC CTC GGC GCC TCG TCG CTG ACC TTC AAG	831	
Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys		
210 215 220		
AAC GGC ACC GCC AAC GAC GGC CTG GTC GGC ACC TGC AGT TCG CAC CTG	879	
Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu		
225 230 235		
GGC ATG GTG ATC CGC GAC AAC TAC CGG ATG AAC CAC CTG GAC GAG GTG	927	
Gly Met Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val		
240 245 250 255		
AAC CAG GTC CTC GGC CTC ACC AGC CTG TTC GAG ACC AGC CCG GTC AGC	975	
Asn Gln Val Leu Gly Leu Thr Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser		
260 265 270		
GTC TAC CGC CAG CAC GCC AAC CGC CTG AAG AAC GCC AGC CTG	1017	
Val Tyr Arg Gln His Ala Asn Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu		
275 280 285		
TAGGACCCCG GCCGGGGCCT CGGCCCGGGC CCG		1050

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 311 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Met Lys Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala	
-26 -25 -20 -15	
Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr	
-10 -5 1 5	
Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile	
10 15 20	
Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile Pro Asn Ala Leu Arg Arg Asp	
25 30 35	

Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Gly Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu
 40 45 50

Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Val Glu Glu Ile Val Ala Leu
 55 60 65 70

Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile Gly His Ser His Gly Gly Pro
 75 80 85

Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala
 90 95 100

Thr Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu
 105 110 115

Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu
 120 125 130

Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser Phe Leu Ser Ser Gly Gly Thr
 135 140 145 150

Gly Thr Gln Asn Leu Leu Gly Ser Leu Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly
 155 160 165

Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala
 170 175 180

Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp
 185 190 195

Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe
 200 205 210

Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly
 215 220 225 230

Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu Gly Met Val Ile Arg Asp Asn
 235 240 245

Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val Asn Gln Val Leu Gly Leu Thr
 250 255 260

Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser Val Tyr Arg Gln His Ala Asn
 265 270 275

Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu
 280 285

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 1049 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: nicht bekannt
 - (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 85..1017

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
 (B) LAGE: 163..1017

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

GGATCCCCCG	GTTCTCCGG	AAGGATTCTGG	GCGATGGCTG	GCAGGACGCG	CCCCTCGGCC	60										
CCATCAACCT	GAGATGAGAA	CAAC	ATG	AAG	AAG	111										
			Met	Lys	Lys	Ser	Leu	Leu	Pro	Leu						
			-26	-25					-20							
GGC	CTG	GCC	ATC	GGT	CTC	GCC	AGC	CCT	CTG	ATC	CAG	159				
Gly	Leu	Ala	Ile	Gly	Leu	Ala	Ser	Leu	Ala	Ser	Pro	Leu	Ile	Gln		
-15				-10							-5					
GCC	AGC	ACC	TAC	ACC	CAG	ACC	AAA	TAC	CCC	ATC	GTG	CTG	GCC	CAC	GGC	207
Ala	Ser	Thr	Tyr	Thr	Gln	Thr	Lys	Tyr	Pro	Ile	Val	Leu	Ala	His	Gly	
1		5							10					15		
ATG	CTC	GGC	TTC	GAC	AAC	ATC	CTT	GGG	GTC	GAC	TAC	TGG	TTC	GGC	ATT	255
Met	Leu	Gly	Phe	Asp	Asn	Ile	Leu	Gly	Val	Asp	Tyr	Trp	Phe	Gly	Ile	
20			25									30				
CCC	AGC	GCC	TTG	CGC	CGT	GAC	GGT	GCC	CAG	GTC	TAC	GTC	ACC	GAA	GGC	303
Pro	Ser	Ala	Leu	Arg	Arg	Asp	Gly	Ala	Gln	Val	Tyr	Val	Thr	Glu	Gly	
35				40								45				
AGC	CAG	TTG	GAC	ACC	TCG	GAA	GTC	CGC	GGC	GAG	CAG	TTG	CTG	CAA	CAG	351
Ser	Gln	Leu	Asp	Thr	Ser	Glu	Val	Arg	Gly	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Gln	
50				55								60				
GTG	GAG	GAA	ATC	GTC	GCC	CTC	AGC	GGC	CAG	CCC	AAG	GTC	AAC	CTG	ATC	399
Val	Glu	Glu	Ile	Val	Ala	Leu	Ser	Gly	Gln	Pro	Lys	Val	Asn	Leu	Ile	
65				70								75				
GGC	CAC	AGC	CAC	GGC	GGG	CCG	ACC	ATC	CGC	TAC	GTC	GCC	GCC	GTA	CGT	447
Gly	His	Ser	His	Gly	Gly	Pro	Thr	Ile	Arg	Tyr	Val	Ala	Ala	Val	Arg	
80				85					90					95		
CCC	GAC	CTG	ATC	GCT	TCC	GCC	ACC	AGC	GTC	GGC	GCC	CCG	CAC	AGG	GGT	495
Pro	Asp	Leu	Ile	Ala	Ser	Ala	Thr	Ser	Val	Gly	Ala	Pro	His	Arg	Gly	
100									105				110			
TCG	GAC	ACC	GCC	GAC	TTC	CTG	CGC	CAG	ATC	CCA	CCG	GGT	TCG	GCC	GGC	543
Ser	Asp	Thr	Ala	Asp	Phe	Leu	Arg	Gln	Ile	Pro	Pro	Gly	Ser	Ala	Gly	
115									120				125			
GAG	GCA	GTC	CTC	TCC	GGG	CTG	GTC	AAC	AGC	CTC	GGC	GCG	CTG	ATC	AGC	591
Glu	Ala	Val	Leu	Ser	Gly	Leu	Val	Asn	Ser	Leu	Gly	Ala	Leu	Ile	Ser	
130					135							140				
TTC	CTT	TCC	AGC	GGC	GGC	ACC	GGT	ACG	CAG	AAT	TTA	CTG	GGC	TCG	CTG	639
Phe	Leu	Ser	Ser	Gly	Gly	Thr	Gly	Thr	Gln	Asn	Leu	Leu	Gly	Ser	Leu	
145						150						155				

GAG TCG CTG AAC AGT GAG GGT GCC GCG CGC TTC AAC GCC AAG TAC CCG	687
Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro	
160 165 170 175	
CAG GGC ATC CCC ACC TCG GCC TGC GGC GAA GGC GCT TAC AAG GTC AAC	735
Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn	
180 185 190	
GGC GTG AGC TAT TAC TCC TGG AGC GGT TCC TCG CCG CTG ACC AAC TTC	783
Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe	
195 200 205	
CTC GAT CCG AGC GAC GCC TTC CTC GGC GCC TCG TCG CTG ACC AAC TTC	831
Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys	
210 215 220	
AAC GGC ACC GCC AAC GAC GGC CTG GTC GGC ACC TGC AGT TCG CAC CTG	879
Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu	
225 230 235	
GGC ATG GTG ATC CGC GAC AAC TAC CGG ATG AAC CAC CTG GAC GAG GTG	927
Gly Met Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val	
240 245 250 255	
AAC CAG GTC CTC GGC CTC ACC AGC CTG TTC GAG ACC AGC CCG GTC AGC	975
Asn Gln Val Leu Gly Leu Thr Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser	
260 265 270	
GTC TAC CGC CAG CAC GCC AAC CGC CTG AAG AAC GCC AGC CTG	1017
Val Tyr Arg Gln His Ala Asn Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu	
275 280 285	
TAGGACCCCG GCCGGGGCCT CGGCCCGGGC CC	
	1049

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 311 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Met Lys Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala	
-26 -25 -20 -15	
Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr	
-10 -5 1 5	
Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile	
10 15 20	
Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp	
25 30 35	
Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Gly Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu	
40 45 50	



Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln Val Glu Glu Ile Val Ala Leu
 55 60 65 70

Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile Gly His Ser His Gly Gly Pro
 75 80 85

Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala
 90 95 100

Thr Ser Val Gly Ala Pro His Arg Gly Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu
 105 110 115

Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu
 120 125 130

Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser Phe Leu Ser Ser Gly Gly Thr
 135 140 145 150

Gly Thr Gln Asn Leu Leu Gly Ser Leu Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly
 155 160 165

Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala
 170 175 180

Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp
 185 190 195

Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe
 200 205 210

Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly
 215 220 225 230

Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu Gly Met Val Ile Arg Asp Asn
 235 240 245

Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val Asn Gln Val Leu Gly Leu Thr
 250 255 260

Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser Val Tyr Arg Gln His Ala Asn
 265 270 275

Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu
 280 285

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 1049 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: nicht bekannt
 - (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 - (B) LAGE: 85..1017



(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
 (B) LAGE:163..1017

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

GGATCCCCGG GTTCTCCCGG AAGGATTCCGG GCGATGGCTG GCAGGACGCG CCCCTCGGCC 60
 CCATCAACCT GAGATGAGAA CAAC ATG AAG AAG AAG TCT CTG CTC CCC CTC 111
 Met Lys Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu
 -26 -25 -20
 GGC CTG GCC ATC GGT CTC GCC TCT CTC GCT GCC AGC CCT CTG ATC CAG 159
 Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln
 -15 -10 -5
 GCC AGC ACC TAC ACC CAG ACC AAA TAC CCC ATC GTG CTG GCC CAC GGC 207
 Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly
 1 5 10 15
 ATG CTC GGC TTC GAC AAC ATC CTT GGG GTC GAC TAC TGG TTC GGC ATT 255
 Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile
 20 25 30
 CCC AGC GCC TTG CGC CGT GAC GGT GCC CAG GTC TAC GTC ACC GAA GGC 303
 Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Gly
 35 40 45
 AGC CAG TTG GAC ACC TCG GAA GTC CGC GGC GAG CAG TTG CTG CAA CAG 351
 Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln
 50 55 60
 GTG GAG GAA ATC GTC GCC CTC AGC GGC CAG CCC AAG GTC AAC CTG ATC 399
 Val Glu Glu Ile Val Ala Leu Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile
 65 70 75
 GGC CAC AGC CAC GGC GGG CCG ACC ATC CGC TAC GTC GCC GCC GTA CGT 447
 Gly His Ser His Gly Gly Pro Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg
 80 85 90 95
 CCC GAC CTG ATC GCT TCC GCC ACC AGC GTC GGC GCC CCG CAC AAG GGT 495
 Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala Thr Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly
 100 105 110
 TCG GAC ACC GCC GAC TTC CTG CGC CAG ATC CCA CCG GGT TCG GCC GGC 543
 Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly
 115 120 125
 GAG GCA GTC CTC TCC GGG CTG GTC AAC AGC CTC GGC GCG CTG ATC AGC 591
 Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser
 130 135 140
 TTC CTT TCC AGC GGC GGC ATC GGT ACG CAG AAT TTT CTG GGC TCG CTG 639
 Phe Leu Ser Ser Gly Gly Ile Gly Thr Gln Asn Phe Leu Gly Ser Leu
 145 150 155



GAG TCG CTG AAC AGC GAG GGT GCC GCG CGC TTC AAC GCC AAG TAC CCG	687
Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro	
160 165 170 175	
CAG GGC ATC CCC ACC TCG GCC TGC GGC GAA GGC GCC TAC AAG GTC AAC	735
Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn	
180 185 190	
GGC GTG AGC TAT TAC TCC TGG AGC GGT TCC TCG CCG CTG ACC AAC TTC	783
Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe	
195 200 205	
CTC GAT CCG AGC GAC GCC TTC CTC GGC GCC TCG TCG CTG ACC TTC AAG	831
Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys	
210 215 220	
AAC GGC ACC GCC AAC GAC GGC CTG GTC GGC ACC TGC AGT TCG CAC CTG	879
Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu	
225 230 235	
GGC ATG GTG ATC CGC GAC AAC TAC CGG ATG AAC CAC CTG GAC GAG GTG	927
Gly Met Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val	
240 245 250 255	
AAC CAG GTC TTC GGC CTC ACC AGC CTG TTC GAG ACC AGC CCG GTC AGC	975
Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser	
260 265 270	
GTC TAC CGC CAG CAC GCC AAC CGC CTG AAG AAC GCC AGC CTG	1017
Val Tyr Arg Gln His Ala Asn Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu	
275 280 285	
TAGGACCCCG GCCGGGGCCT CGGCCCGGGC CC	
1049	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 311 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

Met Lys Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala	
-26 -25 -20 -15	
Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr	
-10 -5 1 5	
Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile	
10 15 20	
Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp	
25 30 35	

Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Gly Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu
 40 45 50

Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln Val Glu Glu Ile Val Ala Leu
 55 60 65 70

Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile Gly His Ser His Gly Pro
 75 80 85

Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala
 90 95 100

Thr Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu
 105 110 115

Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu
 120 125 130

Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser Phe Leu Ser Ser Gly Gly Ile
 135 140 145 150

Gly Thr Gln Asn Phe Leu Gly Ser Leu Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly
 155 160 165

Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala
 170 175 180

Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp
 185 190 195

Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe
 200 205 210

Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly
 215 220 225 230

Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu Gly Met Val Ile Arg Asp Asn
 235 240 245

Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr
 250 255 260

Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser Val Tyr Arg Gln His Ala Asn
 265 270 275

Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu
 280 285

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 1049 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: nicht bekannt
 - (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 85..1017

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
- (B) LAGE: 163..1017

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

GGATCCCCCG GTTCTCCCGG AAGGATTCCGG GCGATGGCTG GCAGGACGCG CCCCTCGGCC	60
CCATCAACCT GAGATGAGAA CAAC ATG AAG AAG AAG TCT CTG CTC CCC CTC Met Lys Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu -26 -25 -20	111
GGC CTG GCC ATC GGT CTC GCC TCT CTC GCT GCC AGC CCT CTG ATC CAG Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln -15 -10 -5	159
GCC AGC ACC TAC ACC CAG ACC AAA TAC CCC ATC GTG CTG GCC CAC GGC Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly 1 5 10 15	207
ATG CTC GGC TTC GAC AAC ATC CTT GGG GTC GAC TAC TGG TTC GGC ATT Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile 20 25 30	255
CCC AGC GCC TTG CGC CGT GAC GGT GCC CAG GTC TAC GTC ACC GAA GGC Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Gly 35 40 45	303
AGC CAG TTG GAC ACC TCG GAA GTC CGC GGC GAG CAG TTG CTG CAA CAG Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln 50 55 60	351
GTG GAG GAA ATC GTC GCC CTC AGC GGC CAG CCC AAG GTC AAC CTG ATC Val Glu Glu Ile Val Ala Leu Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile 65 70 75	399
GGC CAC AGC CAC GGC GGG CCG ACC ATC CGC TAC GTC GGC GCC GTA CGT Gly His Ser His Gly Gly Pro Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg 80 85 90 95	447
CCC GAC CTG ATC GCT TCC GCC ACC AGC GTC GGC GCC CCG CAC AAG GGT Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala Thr Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly 100 105 110	495
TCG GAC ACC GCC GAC TTC CTG CGC CAG ATC CCA CCG GGT TCG GCC GGC Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly 115 120 125	543
GAG GCA GTC CTC TCC GGG CTG GTC AAC AGC CTC GGC GCG CTG ATC AGC Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser 130 135 140	591



TTC CTT TCC AGC GGC GGC ACC GGT ACG CAG AAT TTA CTG GGC TCG CTG Phe Leu Ser Ser Gly Gly Thr Gly Thr Gln Asn Leu Leu Gly Ser Leu 145 150 155	639
GAG TCG CTG AAC AGC GAG GGT GCC GCG CGC TTC AAC GCC AAG TAC CCG Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro 160 165 170 175	687
CAG GGC ATC CCC ACC TCG GCC TGC GGC GAA GGC GCC TAC AAG GTC AAC Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn 180 185 190	735
GGC GTG AGC TAT TAC TCC TGG AGC GGT TCC TCG CCG CTG ACC AAC TTC Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe 195 200 205	783
CTC GAT CCG AGC GAC GCC TTC CTC GGC GCC TCG TCG CTG ACC TTC AAG Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys 210 215 220	831
AAC GGC ACC GCC AAC GAC GGC CTG GTC GGC ACC TGC AGT TCG CAC CTG Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu 225 230 235	879
GGC ATG GTG ATC CGC GAC AAC TAC CGG ATG AAC CAC CTG GAC GAG GTG Gly Met Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val 240 245 250 255	927
AAC CAG GTC TTC GGC CTC ACC AGC CTG TTC GAG ACC AGC CCG GTC AGC Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser 260 265 270	975
GTC TAC CGC CAG CAC GCC AAC CGC CTG AAG AAC GCC AGC CTG Val Tyr Arg Gln His Ala Asn Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu 275 280 285	1017
TAGGACCCCG GCCGGGGCCT CGGCCCGGGC CC 1049	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 311 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

Met Lys Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala -26 -25 -20 -15
Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr -10 -5 1 5
Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile 10 15 20



Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp
 25 30 35
 Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Gly Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu
 40 45 50
 Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln Val Glu Glu Ile Val Ala Leu
 55 60 65 70
 Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile Gly His Ser His Gly Gly Pro
 75 80 85
 Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala
 90 95 100
 Thr Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu
 105 110 115
 Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu
 120 125 130
 Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser Phe Leu Ser Ser Gly Gly Thr
 135 140 145 150
 Gly Thr Gln Asn Leu Leu Gly Ser Leu Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly
 155 160 165
 Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala
 170 175 180
 Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp
 185 190 195
 Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe
 200 205 210
 Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly
 215 220 225 230
 Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu Gly Met Val Ile Arg Asp Asn
 235 240 245
 Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr
 250 255 260
 Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser Val Tyr Arg Gln His Ala Asn
 265 270 275
 Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu
 280 285

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: nicht bekannt
 - (D) TOPOLOGIE: linear



(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetische DNA"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

GCGCAATTAA CCCTCACTAA AGGGAACAAA

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 25 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetische DNA"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

GGTACGGAGA ATNNNCTGGG CTCGC

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetische DNA"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

GCGTAATAACG ACTCACTATA GGGCGAA

27



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/55, 15/10, 9/20, 1/21, C12Q 1/44		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/05288
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 4. Februar 1999 (04.02.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/04612		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmelddatum: 23. Juli 1998 (23.07.98)			
(30) Prioritätsdaten: 197 31 990.4 25. Juli 1997 (25.07.97)		DE	Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen. Mit Angaben über hinterlegtes biologisches Material, eingereicht gemäss Regel 13bis getrennt von der Beschreibung.</i>
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): STUDIENGESELLSCHAFT KOHLE MBH [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): REETZ, Manfred, T. [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr (DE); ZONTA, Albin [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr (DE). SCHIMOSSEK, Klaus [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr (DE). LIEBETON, Klaus [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr (DE). JÄGER, Karl-Erich [DE/DE]; Ruhr Universität Bochum, Fakultät f. Biologie, Universitätsstrasse 150, D-44790 Bochum (DE).			
(74) Anwälte: VON KREISLER, Alek usw.; Deichmannhaus am Hauptbahnhof, Bahnhofsvorplatz, D-50667 Köln (DE).			
(54) Title: METHOD FOR PRODUCING AND IDENTIFYING NEW HYDROLASES HAVING IMPROVED PROPERTIES			
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG UND IDENTIFIZIERUNG VON NEUEN HYDROLASEN MIT VERBESSERTEN EIGENSCHAFTEN			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to a method for producing and identifying hydrolase mutants having improved properties regarding stereoselectivity and site selectivity, catalytic activity or stability during chemical reactions.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung und Identifizierung von Hydrolase-Mutanten mit verbesserten Eigenschaften hinsichtlich der Stereo- oder Regioselektivität, katalytischen Aktivität oder Stabilität bei chemischen Umsetzungen.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/04612

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/55 C12N15/10 C12N9/20 C12N1/21 C12Q1/44

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category ^o	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHINKAI A ET AL: "Substitutions of Ser for Asn-163 and Pro for Leu-264 are important for stabilization of lipase from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ." JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, (1996 NOV) 120 (5) 915-21. JOURNAL CODE: HIF. ISSN: 0021-924X., XP002087459 Japan see the whole document	1,2,11, 12, 22-26, 29,31, 32,34
Y	---	1-34 -/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

19 April 1999

17.05.99

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van der Schaal, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 98/04612

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	STADLER P ET AL: "Stereoselectivity of microbial lipases. The substitution at position sn-2 of triacylglycerol analogs influences the stereoselectivity of different microbial lipases." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, (1995 JAN 15) 227 (1-2) 335-43. JOURNAL CODE: EMZ. ISSN: 0014-2956., XP002087460 GERMANY: Germany, Federal Republic of see page 335, left-hand column - page 335, right-hand column, paragraph 1 ---	1-34
Y	DE 44 08 152 A (STUDIENGESELLSCHAFT KOHLE MBH) 14 September 1995 see page 2, line 16 - line 18 see page 2, line 28 ---	1-12, 21-26, 29, 31
Y	LEUNG D ET AL: "A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction" TECHNIQUE, vol. 1, no. 1, August 1989, pages 11-15, XP002087461 cited in the application see the whole document ---	1-34
Y	CADWELL R AND JOYCE G ET AL: "Randomization of genes by PCR mutagenesis" PCR METHODS AND APPLICATIONS, vol. 2, 1992, pages 28-33, XP002087462 see the whole document insbesondere see page 30, left-hand column, paragraph 2 see page 31, middle column, last paragraph ---	1-34
Y	STEMMER W: "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 91, October 1994, pages 10747-10751, XP002087463 WASHINGTON US see the whole document ---	1-34
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

tional Application No

PCT/EP 98/04612

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZHANG J-H ET AL: "Directed evolution of a fucosidase from galactosidase by DNA shuffling and screening" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 94, April 1997, pages 4504-4509, XP002087464 WASHINGTON US see the whole document ---	1-34
A	UZAWA H ET AL: "Determination of the lipase stereoselectivities using circular dichroism (CD); lipases produce chiral di-O-acylglycerols from achiral tri-O-acylglycerols." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, (1993 JUL 1) 1168 (3) 253-60. JOURNAL CODE: AOW. ISSN: 0006-3002., XP002087466 Netherlands see the whole document ---	
Y	ZANDONELLA G ET AL: "Enantiomeric perylene-glycerolipids as fluorogenic substrates for a dual wavelength assay of lipase activity and stereoselectivity." CHIRALITY, (1996) 8 (7) 481-89. JOURNAL CODE: AVD. ISSN: 0899-0042., XP002087465 United States see the whole document ---	13-15, 20,35
Y	EP 0 443 063 A (HENKEL RESEARCH CORP) 28 August 1991 see example 5 ---	13-15, 20,35
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 9409 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 94-068478 XP002100284 & JP 06 014772 A (NAGASE SANGYO KK) , 25 January 1994 see abstract ---	13-15, 20,35
Y	WO 97 20918 A (RECOMBINANT BIOCATALYSIS INC) 12 June 1997 see example 4 ---	13,14, 19,20,35
Y	BERGMEYER H: "Methods of enzymatic analysis. Volume II" 1986, METHODS OF ENZYMATIC ANALYSIS, SAMPLES, REAGENTS, ASSESSMENT OF RESULT, NR. VOL. 2, PAGE(S) 236 - 239, BERGMEYER H U XP002100288 see the whole document ---	16,20

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/04612

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MUDERHWA J ET AL: "Purification and properties of the lipases from <i>Rhodotorula pilimanae</i> Hedrick and Burke" APPLIED MICROBIOLOGY BIOTECHNOLOGY, vol. 23, 1986, pages 348-354, XP002087467 see page 349, left-hand column, paragraph 4 ---	16,20
Y	JENSEN R ET AL: "Determination of lipase specificity" LIPIDS, vol. 18, no. 3, 1983, pages 239-252, XP002100282 see page 247, left-hand column, paragraph 1 see page 248, left-hand column, line 2 ---	17,18, 20,35
Y	DE 44 13 121 A (SCHURIG VOLKER PROF DR) 16 February 1995 see the whole document ---	19,20
Y	WO 91 15581 A (CREA ROBERTO) 17 October 1991 see page 3, last paragraph - page 4 ---	21
X	ZANDONELLA G ET AL: "Inversion of lipase stereospecificity for fluorogenic alkyldiacyl glycerols." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 231, 1995, pages 50-55, XP002100283 see abstract see page 51, right-hand column, paragraph 6 - paragraph 7 ---	35
Y	REETZ, MANFRED T. ET AL: "Creation of enantioselective biocatalysts for organic chemistry by <i>in vitro</i> evolution" ANGEW. CHEM., INT. ED. ENGL. (1998), VOLUME DATE 1997, 36(24), 2830-2832 CODEN: ACIEAY; ISSN: 0570-0833, XP002087468 see page 2831, left-hand column, paragraph 3 - page R ---	13,14,20 1-15,20, 22-35
P,X	REETZ M T ET AL: "Overexpression, immobilization and biotechnological application of <i>Pseudomonas</i> lipases." CHEMISTRY AND PHYSICS OF LIPIDS, (1998 JUN) 93 (1-2) 3-14. REF: 75 JOURNAL CODE: CZW. ISSN: 0009-3084., XP002087469 Ireland see page 11 - page 12 -----	1-15, 20-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP98/04612

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Supplemental Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP98/04612

The International Searching Authority has found that this international application contains several (groups of) inventions, as follows:

1. Claims: 13-20, 27, 28, 30, 32-34 totally and 1-12, 21-26, 29, 31 partially

Method for producing and identifying hydrolase mutants with improved stereoselectivity and site selectivity and the DNA sequences thereof.

2. Claims: 1-12, 21-26, 29, 31 partially

Method for producing and identifying hydrolase mutants with improved catalytic activity and the DNA sequences thereof.

3. Claims: 1-12, 21-26, 29, 31 partially

Method for producing and identifying hydrolase mutants with improved stability and the DNA sequences thereof.

4. Claim: 35

Method for testing catalysts.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/04612

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
DE 4408152	A 14-09-1995	CA 2144218	A 12-09-1995	EP 0676414	A 11-10-1995
		JP 7274964	A 24-10-1995	US 5817493	A 06-10-1998
EP 0443063	A 28-08-1991	NONE			
WO 9720918	A 12-06-1997	AU 1148997	A 27-06-1997	CA 2239686	A 12-06-1997
		EP 0866853	A 30-09-1998		
DE 4413121	A 16-02-1995	NONE			
WO 9115581	A 17-10-1991	AT 126535	T 15-09-1995	AU 653152	B 22-09-1994
		AU 7741891	A 30-10-1991	CA 2079802	A 06-10-1991
		DE 69112207	D 21-09-1995	DE 69112207	T 28-03-1996
		EP 0527809	A 24-02-1993	ES 2078518	T 16-12-1995
		US 5830650	A 03-11-1998	US 5798208	A 25-08-1998



INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/04612

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 6 C12N15/55 C12N15/10 C12N9/20 C12N1/21 C12Q1/44

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 6 C12N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SHINKAI A ET AL: "Substitutions of Ser for Asn-163 and Pro for Leu-264 are important for stabilization of lipase from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ." JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, (1996 NOV) 120 (5) 915-21. JOURNAL CODE: HIF. ISSN: 0021-924X., XP002087459 Japan siehe das ganze Dokument ---	1,2,11, 12, 22-26, 29,31, 32,34
Y	---	1-34 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

19. April 1999

17.05.99

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Van der Schaal, C

INTERNATIONALER FORSCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/04612

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	STADLER P ET AL: "Stereoselectivity of microbial lipases. The substitution at position sn-2 of triacylglycerol analogs influences the stereoselectivity of different microbial lipases." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, (1995 JAN 15) 227 (1-2) 335-43. JOURNAL CODE: EMZ. ISSN: 0014-2956., XP002087460 GERMANY: Germany, Federal Republic of siehe Seite 335, linke Spalte - Seite 335, rechte Spalte, Absatz 1 ---	1-34
Y	DE 44 08 152 A (STUDIENGESELLSCHAFT KOHLE MBH) 14. September 1995 siehe Seite 2, Zeile 16 - Zeile 18 siehe Seite 2, Zeile 28 ---	1-12, 21-26, 29, 31
Y	LEUNG D ET AL: "A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction" TECHNIQUE, Bd. 1, Nr. 1, August 1989, Seiten 11-15, XP002087461 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-34
Y	CADWELL R AND JOYCE G ET AL: "Randomization of genes by PCR mutagenesis" PCR METHODS AND APPLICATIONS, Bd. 2, 1992, Seiten 28-33, XP002087462 siehe das ganze Dokument insbesondere siehe Seite 30, linke Spalte, Absatz 2 siehe Seite 31, mittlere Spalte, letzter Absatz ---	1-34
Y	STEMMER W: "DNA shuffling by random fragmentatio and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd. 91, Oktober 1994, Seiten 10747-10751, XP002087463 WASHINGTON US siehe das ganze Dokument --- -/-	1-34

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

tionales Aktenzeichen

PCT/EP 98/04612

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	ZHANG J-H ET AL: "Directed evolution of a fucosidase from galactosidase by DNA shuffling and screening" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd. 94, April 1997, Seiten 4504-4509, XP002087464 WASHINGTON US siehe das ganze Dokument ----	1-34
A	UZAWA H ET AL: "Determination of the lipase stereoselectivities using circular dichroism (CD); lipases produce chiral di-0-acylglycerols from achiral tri-0-acylglycerols." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, (1993 JUL 1) 1168 (3) 253-60. JOURNAL CODE: AOW. ISSN: 0006-3002., XP002087466 Netherlands siehe das ganze Dokument ----	
Y	ZANDONELLA G ET AL: "Enantiomeric perylene-glycerolipids as fluorogenic substrates for a dual wavelength assay of lipase activity and stereoselectivity." CHIRALITY, (1996) 8 (7) 481-89. JOURNAL CODE: AVD. ISSN: 0899-0042., XP002087465 United States siehe das ganze Dokument ----	13-15, 20,35
Y	EP 0 443 063 A (HENKEL RESEARCH CORP) 28. August 1991 siehe Beispiel 5 ----	13-15, 20,35
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 9409 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 94-068478 XP002100284 & JP 06 014772 A (NAGASE SANGYO KK) , 25. Januar 1994 siehe Zusammenfassung ----	13-15, 20,35
Y	WO 97 20918 A (RECOMBINANT BIOCATALYSIS INC) 12. Juni 1997 siehe Beispiel 4 ----	13,14, 19,20,35
Y	BERGMEYER H: "Methods of enzymatic analysis. Volume II" 1986, METHODS OF ENZYMATIC ANALYSIS, SAMPLES, REAGENTS, ASSESSMENT OF RESULT, NR. VOL. 2, PAGE(S) 236 - 239, BERGMEYER H U XP002100288 siehe das ganze Dokument ----	16,20

-/--

INTERNATIONALER ~~U~~ SICHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/04612

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	MUDERHWA J ET AL: "Purification and properties of the lipases from Rhodotorula pilimanae Hedrick and Burke" APPLIED MICROBIOLOGY BIOTECHNOLOGY, Bd. 23, 1986, Seiten 348-354, XP002087467 siehe Seite 349, linke Spalte, Absatz 4 ---	16,20
Y	JENSEN R ET AL: "Determination of lipase specificity" LIPIDS, Bd. 18, Nr. 3, 1983, Seiten 239-252, XP002100282 siehe Seite 247, linke Spalte, Absatz 1 siehe Seite 248, linke Spalte, Zeile 2 ---	17,18, 20,35
Y	DE 44 13 121 A (SCHURIG VOLKER PROF DR) 16. Februar 1995 siehe das ganze Dokument ---	19,20
Y	WO 91 15581 A (CREA ROBERTO) 17. Oktober 1991 siehe Seite 3, letzter Absatz - Seite 4 ---	21
X	ZANDONELLA G ET AL: "Inversion of lipase stereospecificity for fluorogenic alkyldiacyl glycerols." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 231, 1995, Seiten 50-55, XP002100283 siehe Zusammenfassung siehe Seite 51, rechte Spalte, Absatz 6 - Absatz 7 ---	35
Y	REETZ, MANFRED T. ET AL: "Creation of enantioselective biocatalysts for organic chemistry by in vitro evolution" ANGEW. CHEM., INT. ED. ENGL. (1998), VOLUME DATE 1997, 36(24), 2830-2832 CODEN: ACIEAY; ISSN: 0570-0833, XP002087468 siehe Seite 2831, linke Spalte, Absatz 3 - Seite R ---	13,14,20
P,X	REETZ M T ET AL: "Overexpression, immobilization and biotechnological application of Pseudomonas lipases." CHEMISTRY AND PHYSICS OF LIPIDS, (1998 JUN) 93 (1-2) 3-14. REF: 75 JOURNAL CODE: CZW. ISSN: 0009-3084., XP002087469 Ireland siehe Seite 11 - Seite 12 -----	1-15,20, 22-35
P,X		1-15, 20-34

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHTInternationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/04612**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht rechtfertigbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle rechtfertigbaren Ansprüche.
2. Da für alle rechtfertigbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 13-20 27 28 30 32-34 vollständig 1-12 21-26 29 31 partiell

Verfahren zur Herstellung und Identifizierung von Hydrolase-Mutanten mit verbesserter Stereo- oder Regioselektivität und deren DNA-Sequenzen.

2. Ansprüche: 1-12 21-26 29 31 partiell

Verfahren zur Herstellung und Identifizierung von Hydrolase-Mutanten mit verbesserter katalytischer Aktivität und deren DNA-Sequenzen.

3. Ansprüche: 1-12 21-26 29 31 partiell

Verfahren zur Herstellung und Identifizierung von Hydrolase-Mutanten mit verbesserter Stabilität und deren DNA-Sequenzen.

4. Anspruch : 35

Verfahren zum Test von Katalysatoren

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/04612

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie			Datum der Veröffentlichung
DE 4408152	A 14-09-1995	CA	2144218	A	12-09-1995
		EP	0676414	A	11-10-1995
		JP	7274964	A	24-10-1995
		US	5817493	A	06-10-1998
EP 0443063	A 28-08-1991	KEINE			
WO 9720918	A 12-06-1997	AU	1148997	A	27-06-1997
		CA	2239686	A	12-06-1997
		EP	0866853	A	30-09-1998
DE 4413121	A 16-02-1995	KEINE			
WO 9115581	A 17-10-1991	AT	126535	T	15-09-1995
		AU	653152	B	22-09-1994
		AU	7741891	A	30-10-1991
		CA	2079802	A	06-10-1991
		DE	69112207	D	21-09-1995
		DE	69112207	T	28-03-1996
		EP	0527809	A	24-02-1993
		ES	2078518	T	16-12-1995
		US	5830650	A	03-11-1998
		US	5798208	A	25-08-1998

